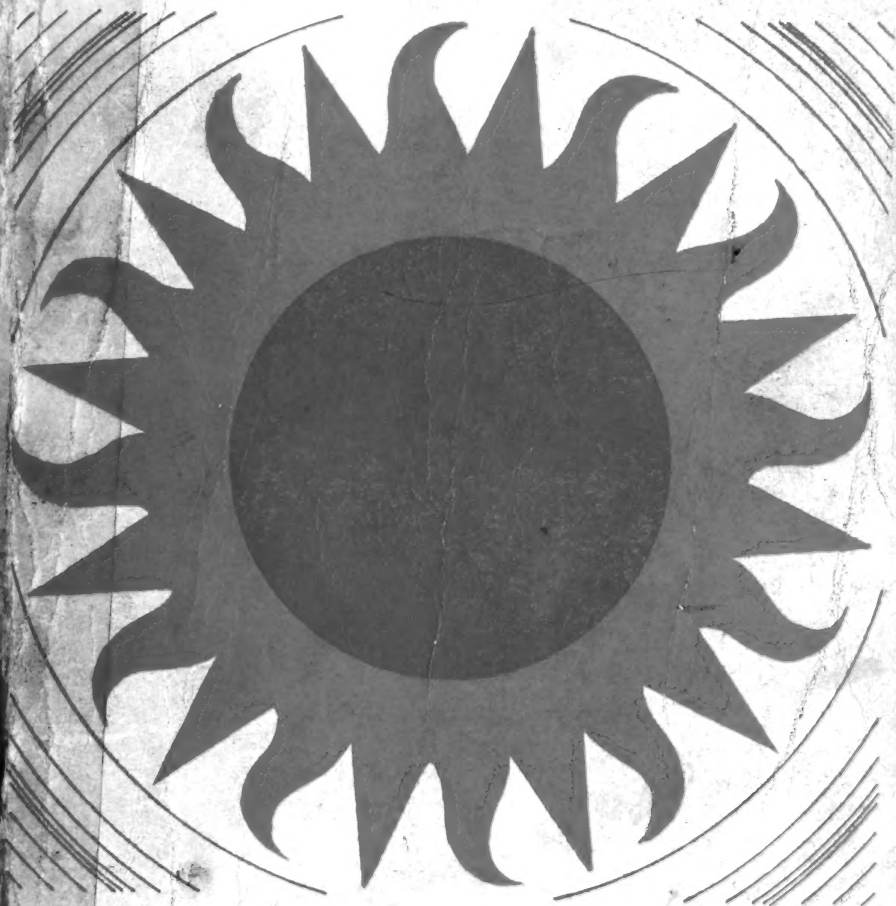
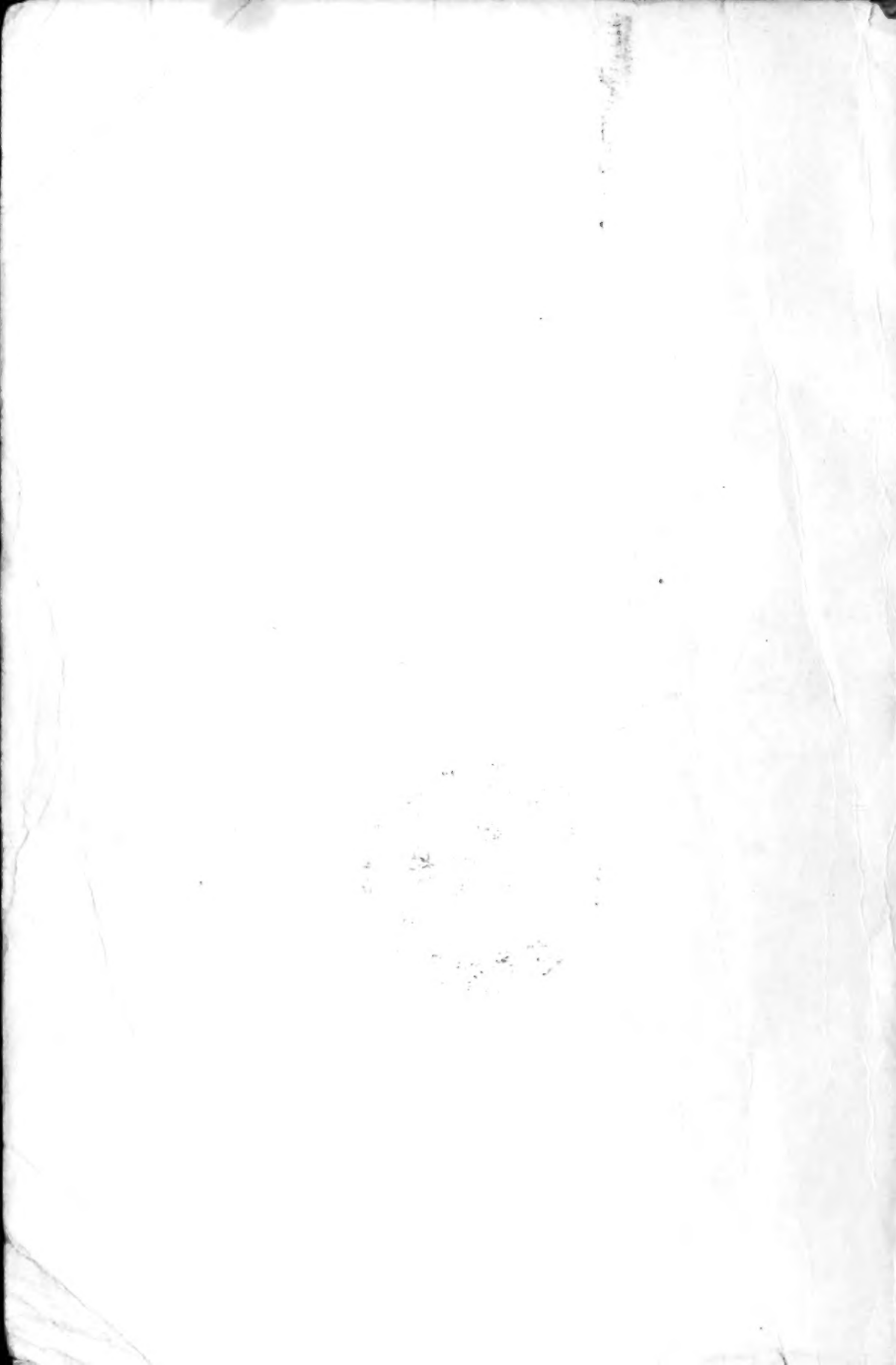


# 光生物学

K. C. 史密斯 编



科学出版社





58.1716  
176

# 光 生 物 学

K. C. 史密斯 编

沈 恂 等 译



科 学 出 版 社

1984

中科院植物所图书馆



S0011838

23615

## 内 容 简 介

本书是介绍光与生物相互关系的一本综合性参考书。它概述了光生物学领域有关重要问题，并引用大量实验说明光与人类目前和将来可能出现的问题的关系。

全书共十五章，分别介绍：光技术与生物实验；光谱学；光化学；光敏化作用；紫外线辐射对分子和细胞的效应；环境光生物学；光医学；生物钟特性；网膜外的光感受；视觉；光形态建成；光运动；光合作用；生物发光以及光生物学研究的新课题。

供从事光生物学、光医学方面工作的科研工作者及有关专业大学生参考。

Edited by Kendric C. Smith

THE SCIENCE OF PHOTOBIOLOGY

Plenum Press, 1977

## 光 生 物 学

K. C. 史密斯 编

沈 恂 等 译

责任编辑 王爱琳

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1984 年 3 月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1984 年 3 月第一次印刷 印张：17 1/4

印数：0001—4,800 字数：396,000

统一书号：13031·2521

本社书号：3460·13-10

定 价： 2.70 元

## 译 者 的 话

光是地球上一切生命的能量来源，它是世上一切生物赖以生存的环境中最重要因素之一。生命的起源和进化离不开光，生物的结构与功能也受到光的强烈影响。光与人类的关系更为密切，视觉离不开光，而人从周围环境中所获信息的绝大部分来自于视觉器官。紫外线可以引起皮肤癌，但光也可以用来治疗肿瘤，肿瘤的研究从光生物学中吸取了很多养分。

光生物学是研究光与生物相互关系的科学，它是一门正在发展的生气勃勃的学科，也是生物物理学的一个重要方面。光生物学在我国还是一门不为很多人了解的学科，除了光合作用和视觉等少数几个分支外，还没有一本完整的介绍光生物学全貌的书，翻译这本书正是为了弥补这个不足。这本书是 1977 年年底问世的，它是世界上第一本系统地介绍光生物学各个分支领域的比较全面的书，各章的作者都是各个分支领域里的权威学者，我们希望这本书的翻译出版将对推动我国光生物学的研究和应用起到一点微薄的作用。

这是一本教课书，除了可供高年级大学生和研究生作为入门的向导外，对大学教师、生物物理学工作者以及从事生物学、医学、环境科学和光化学的其它科学工作者也有一定的参考价值。全书共分 15 章，除最后一章是对光生物学的发展远景和新课题的展望外，其余各章均是阐述光生物学的一个专门分支。

参加本书翻译工作的同志有：沈恂、郭绳武、聂玉生、刁

云程、庞素珍和张茵，全书最后由沈恂同志审校。由于译者水平所限，错误和不妥之处在所难免，欢迎读者批评指正。

译者

1982.5.30.

## 前 言

本书是根据作者多年从事《自动控制原理》课程的教学和科研工作的经验编写而成的。本书可作为高等院校工科各专业《自动控制原理》课程的教材，也可供从事自动控制工作的工程技术人员参考。本书共分八章，第一章至第四章主要介绍自动控制的基本概念、基本原理和基本分析方法，第五章至第八章主要介绍自动控制系统的校正、综合、设计和仿真。本书在编写过程中，参考了国内外许多优秀的教材和有关文献，力求做到概念清晰、重点突出、由浅入深、循序渐进。本书可作为高等院校工科各专业《自动控制原理》课程的教材，也可供从事自动控制工作的工程技术人员参考。

本书在编写过程中，得到了许多同志的帮助，特别是沈恂同志对本书的编写提出了许多宝贵的意见和建议，使本书的质量得到了很大的提高。本书在编写过程中，还参考了国内外许多优秀的教材和有关文献，力求做到概念清晰、重点突出、由浅入深、循序渐进。本书可作为高等院校工科各专业《自动控制原理》课程的教材，也可供从事自动控制工作的工程技术人员参考。

本书在编写过程中，得到了许多同志的帮助，特别是沈恂同志对本书的编写提出了许多宝贵的意见和建议，使本书的质量得到了很大的提高。本书在编写过程中，还参考了国内外许多优秀的教材和有关文献，力求做到概念清晰、重点突出、由浅入深、循序渐进。本书可作为高等院校工科各专业《自动控制原理》课程的教材，也可供从事自动控制工作的工程技术人员参考。

## 前 言

虽然在光生物学的少数几个专门领域有几本很好的书，但是目前还没有一本论及光生物科学所有领域的书，这本书则打算填补这个空白。美洲光生物学学会目前把光生物学划分为 14 个分支领域，本书的前 14 章就是针对这 14 个分支领域的，各章均由该分支领域的权威学者撰写。第 15 章冠以标题“光生物学的新课题”，着重阐述一些也许会在将来成为光生物学分支的研究领域。

这本书是作为一本教课书写的，为的是向高年级大学生和研究生介绍光生物学这门科学，每一章都对一个课题作了内容广泛的介绍，每一章所包含的内容都可以在 1 至 2 小时的综合性讲座里教授给学生，书中的参考文献不是应有尽有，而是开列那些关键性的部分，以帮助学生查阅有关文献资料。书中往往比较多地引用较新的综述性参考文献，而不是引用那些作出原始发现的作者们的第一篇论文。为了以实例说明一章的一个或几个要点，每一章均附供学生实践的课堂演示和实验室练习。这本书并不就是这个领域的研究工作者可以汲取的知识宝库，确切地说，它只想阐述光生物学的每一个专门领域的重要性，并用大量材料说明它们与人类的眼前和长远问题的关系。

在温度（极地和沙漠）、压力（深海潜水和宇宙飞行）和重力（宇宙飞行）对人的生理功能的影响方面，人们已经作了大量的研究，但是时至今日，在研究光对人的影响方面所做的努力仍然很少，然而，光却是我们环境中最重要的因素之一。

作者希望这本书将能作为光生物学入门学习的基本教材，希望它能起到鼓励大学生们跨进光生物学领域的作用。我们还期待这本书将会使光生物学领域外的科学工作者和一切想了解这门学科的外行们产生兴趣，因为甚至对于一般的公众也越来越懂得：无论是自然界的光还是人工的光，它们对人类都有着重大的影响，而决非只是帮助视觉。看来，光生物学作为一门主要学科的时代已经来到了。

K.C.史 密 斯

1977年9月



# 目 录

第 1 章	光技术和生物学实验·····	1
第 2 章	光谱学·····	34
第 3 章	光化学·····	77
第 4 章	光敏化作用·····	105
第 5 章	紫外线对分子和细胞的效应·····	136
第 6 章	环境光生物学·····	175
第 7 章	光医学·····	213
第 8 章	生物钟学(近昼夜节律)·····	253
第 9 章	网膜外的光感受·····	274
第 10 章	视觉·····	291
第 11 章	光形态建成·····	338
第 12 章	光运动·····	377
第 13 章	光合作用·····	398
第 14 章	生物发光·····	447
第 15 章	光生物学的新课题·····	479
索引·····		504
参考文献·····		519

1	第一章 緒言	第一章
2	第二章 光の性質	第二章
3	第三章 光の反射	第三章
4	第四章 光の屈折	第四章
5	第五章 光の干渉	第五章
6	第六章 光の回折	第六章
7	第七章 光の偏光	第七章
8	第八章 光の吸収	第八章
9	第九章 光の散乱	第九章
10	第十章 光の速度	第十章
11	第十一章 光のエネルギー	第十一章
12	第十二章 光の量子性	第十二章
13	第十三章 光の波動性	第十三章
14	第十四章 光の粒子性	第十四章
15	第十五章 光の波粒二重性	第十五章
16	第十六章 光の応用	第十六章
17	第十七章 光の未来	第十七章
18	第十八章 光の歴史	第十八章
19	第十九章 光の文化	第十九章
20	第二十章 光の芸術	第二十章
21	第二十一章 光の科学	第二十一章
22	第二十二章 光の技術	第二十二章
23	第二十三章 光の産業	第二十三章
24	第二十四章 光の社会	第二十四章
25	第二十五章 光の未来	第二十五章



# 第1章 光技术和生物学实验

John Jagger

(得克萨斯大学生物系)

1.1	序言	2
1.2	光源的选择	4
1.2.1	可见辐射	4
1.2.2	近紫外辐射	11
1.2.3	远紫外辐射	13
1.2.4	危害性	13
1.3	光谱输出的窄化	14
1.3.1	单色光源	14
1.3.2	滤光片	15
1.3.3	单色仪	18
1.4	辐射能量的测量	20
1.4.1	名词术语	20
1.4.2	热电堆	21
1.4.3	光电器件	22
1.4.4	化学测量系统(光化计)和生物测量系统	23
1.4.5	一个细胞所“看到的”注量	25
1.5	实验方法	26
1.5.1	样品的吸收	26
1.5.2	存活曲线	28
1.5.3	紫外恢复现象	30
1.5.4	作用光谱	32

## 1.1 序 言

很多光生物学实验可以用十分简单而便宜的设备来做,但是实验者常常发现,在他们完成开头的“粗糙的”实验以后,他一定会越来越关注诸如不同波长的相对效率和所需的准确能量这样的细节。因此,既需要简单的又需要复杂的装置。人们往往采取折衷的方案,只使用那些从实验的可靠性考虑是必不可少的复杂设备。

当然,所用仪器设备的选择取决于问题的性质,如果我们记住下述有关光生物学(不同于光化学或光物理)实验的一般要求,那么在各种各样现有仪器设备中决定取舍时便可以避免许多麻烦和浪费。这些一般要求是:①往往需要高强度的光;②一般不要求很窄的带宽(即不要求很高的单色性);③通常不要求照射时间比几秒钟更短。因此,在光生物学(与光化学相反)工作中往往不需要单色性特别高的激光器和特别短脉冲(毫微秒范围)的脉冲激光器。

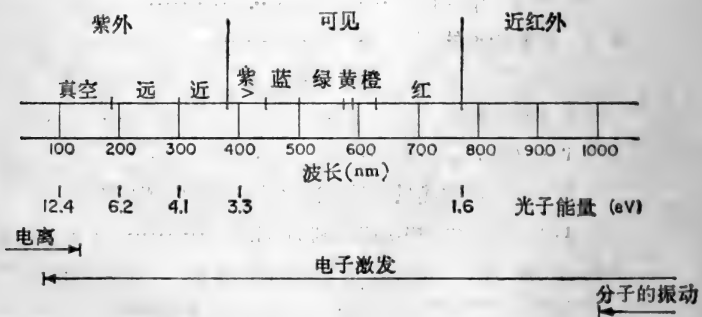


图 1-1 电磁辐射谱的紫外、可见和近红外区,光谱的下方指出在各个区间发生的主要物理事件,如图所示,这些区域的边界并非截然分明。此外,任何光子都能引起一般来讲与能量比它低的光子相联系的事件。

表 1-1 国际单位制 (简称 SI)<sup>a</sup>

名 称	代 号	名 称	代 号
安培	A	勒克斯	lx
卡路里	cal	米	m
坎德拉	cd	毫克	mg
库仑	C	兆电子伏	MeV
居里	Ci	分	min
摄氏度	°C	摩尔	mol
开尔文度	K	纳米	nm
角度	°	牛顿	N
电子伏	eV	欧姆	$\Omega$
尔格	erg	欧姆·厘米	$\Omega \cdot \text{cm}$
法拉	F	百万分之一	ppm
高斯	G	百分比	%
克	g	弧度	rad
亨利	H	仑琴	R
赫兹	Hz	秒	s
小时	h	球面度	sr
焦耳	J	特斯拉	T
千克	kg	托	Torr
兰伯特	L	伏特	V
升	liter	瓦	W
流明	lm	韦伯	Wb

a. 以人名命名的单位不大写,除非在缩写时,所有缩写字既代表复合形式也代表单一形式的单位。

首先要说明几个习惯上的规定,图 1-1 表示了在紫外(UV)、可见和近红外区域光的波长、能量和颜色,为叙述本章起见,我们认为远紫外辐射处于210—300nm范围,而近紫外辐射落在 300—380nm,我们将不考虑真空紫外区或近红外区。有时用“半高宽”(峰值强度一半处的带宽)表征辐射的带宽,在讨论滤光片或者当透射曲线具有高斯形状时,经常是这样表示的。有时用“全宽度”(峰值强度 1%处的带宽)表征辐射的带宽,这种情况经常出现在讨论染料激光器的输出或是单色仪输出的整个波长域的时候。最后,我们将用 SI 单位(国际制单位)表示光谱的能量和功率(表 1-1)。

## 1.2 光源的选择

### 1.2.1 可见辐射

太阳和高瓦数白炽灯二者都是很好的可见辐射光源,但是它们都不大适合于实验工作,这是因为地球表面上的太阳辐射变化很大,且难于引进实验室。此外,阳光和白炽光源都产生太多的不希望的热和红外辐射。

白炽灯仍然在某些情况下使用,特别是在植物研究工作方面。图 1-2 给出地球表面上的太阳辐射的光谱、正常人的视觉敏感光谱(它定义了可见光)和色温为 3475K 的超压强烈溢光灯的发射谱(灯的光谱由它的灯丝温度决定),由于白炽灯产生的热太多,所以它们经常与吸热滤片一起使用,例如 10%的硫酸铜溶液用作滤片(参阅 1.3.2)。一种特别有用的白炽灯是通用电气公司的有色(两色的)聚光灯,这种灯制造时就在其透镜里放有一块干涉滤光片,它们发出相当窄的光谱(半高宽为 50—80nm),但在红外波段仍有发射,这种灯分五种颜色,对廉价获得不精确的作用光谱来说是很很有用的。

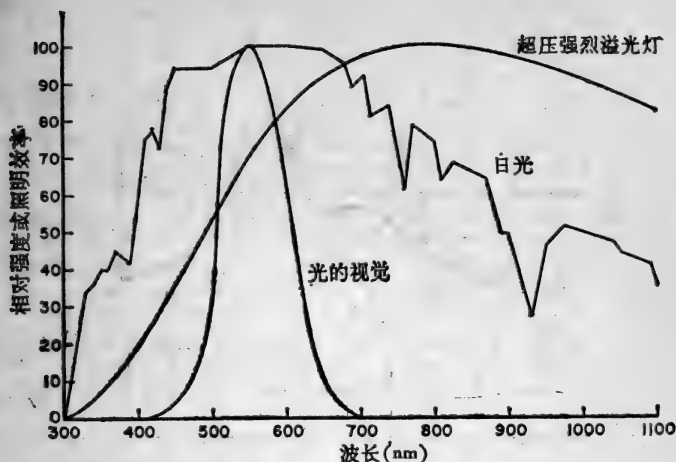


图 1-2 几种光谱: (a) 地球表面上垂直入射的日光, 红区和红外区的减弱是由于水蒸气的吸收 [300-600 nm 区引自: R. D. Cadle and E. R. Allen, *Science* **167**, 243-249 (1970); 650-1100 nm 区引自: R. B. Withrow and A. P. Withrow, chap. 3 in *Radiation Biology*, Vol. III (A. Hollaender, ed.), McGraw-Hill, New York (1956)]. (b) 250 W 超压强烈溢光灯 (色温 3475 K) [引自: R. B. Withrow and A. P. Withrow, Chap. 3 in *Radiation Biology*, Vol. III (A. Hollaender, ed.), McGraw-Hill, New York (1956)]. (c) 人的平均视觉敏感度。

荧光灯是光生物学工作最有用的可见光源, 它们具有相对来讲较高的强度<sup>1)</sup>, 但发热却较少, 它们不是非常亮, 但代之而有的优点是可以照射很大的面积。荧光灯是工作在低气压下(几毫米汞气, 其中含有  $10^{-3}$  mm 的水银蒸气)的水银放电灯, 电子从热灯丝发出并产生水银正离子, 或通过碰撞使汞原子激发, 汞原子中的激发电子再损失能量而处于较低的亚稳态(三线态), 汞原子由这种三线态返回基态时发出 254nm 的辐射。由于汞蒸气气压低, 所以这种辐射能达到灯管的表面。图 1-3 c 表明, 荧光灯发射总能量的 85% 左右属于 254

1) 关于光度学和辐射度学的名词术语, 请参阅 1.4.1 和参考文献 1 的附录 C。

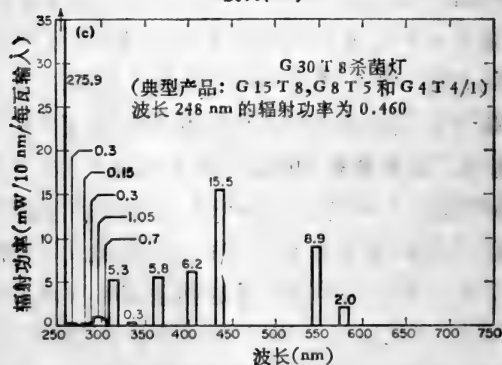
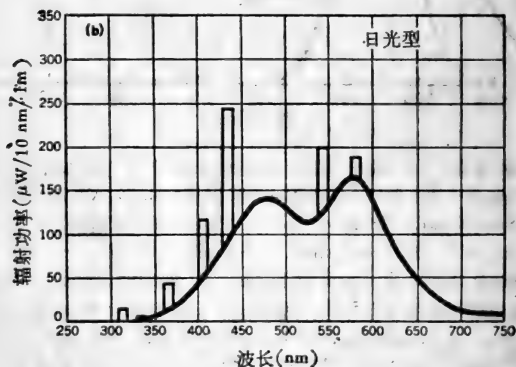
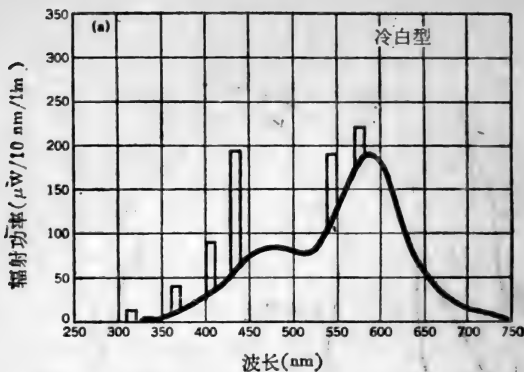


图 1-3 (a) 40W T12 “冷白” 荧光灯; (b) 40W T12 “日光” 荧光灯和 (c) 30W T8 杀菌灯点燃 100 h 后的发射光谱。可以看到, 在所有三个谱中 300nm 以上的区域都出现相同的汞线。对杀菌灯, 254nm 的光辐射占全部辐射功率的 85% 左右, 但该比例将随灯龄而减小, 并随使灯温升高的周围光屏蔽而减小。

nm 波长,而少量辐射的波长比 254nm 长,总能量中那 15% 的辐射代表了高能级到亚稳态的跃迁。在杀菌灯中,所有这些辐射都能射出荧光灯管,而在荧光灯中,涂在灯管内壁上的磷光物质(例如磷酸钙)吸收了远紫外辐射而重新发出连续平坦的可见荧光,因此,荧光灯(图 1-3 a, b)的输出由这种荧光连续谱叠加在长波长的汞线上构成。荧光灯外壳由玻璃制成,玻璃将吸收剩余的远紫外辐射,并减弱荧光紫外成分的强度。

三家主要的美国公司(通用电气、GTE-席尔伐尼亚,西屋)生产的这类型式的荧光灯(例如“日光”型,“冷-白”型)实际上是相同的,图 1-4 表明,可以得到具有不同光谱特性的荧光灯,当人们希望避免特定波长的光时,这些荧光灯中的某些对一般的室内照明是有用的[例如,用金荧光灯防止细菌的光复活(参阅 1.5.3 和 5.4.2),这种细菌的光复活仅仅发生在 500 nm 以下]。对植物生长有最佳输出的荧光灯由几家公司生产(图 1-5)。

必须认识到各种“白色”荧光灯的光谱输出可能有很大的区别,因此,“日光”型灯的发射谱与“冷白”型灯的发射谱是相当不同的(见图 1-3)。

杀菌灯和荧光灯有各种形状和大小,15W 的尺寸用在一般的台灯架里较方便,这种灯需要一个变压器-镇流器和一个启动器,两者常常装在灯架里面。

杀菌灯和荧光灯的输出在头 100 h 燃点时变化很大,用前应对灯进行“老化”100 h,其次,在点燃的头几分钟输出变化很大,故而在使用前应对灯“预热”约 10 分钟。灯的输出随灯的温度明显改变,而灯的温度又受限制灯光方向的灯罩离它远近的影响,没有任何通风的有罩的灯将工作在较高的温度下,其输出将较低,并且灯的发射谱将位移。

荧光灯变通性大、稳定、价廉并易于使用,它们显然是可

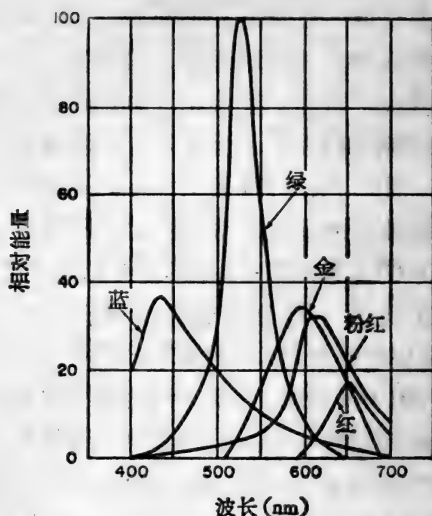


图 1-4 相同瓦数的各种有色荧光灯的光谱输出,汞的谱线未画。

供选择的工作在可见光区的光源。但是,对某些应用来讲,需要更亮的光源,于是人们往往转向高压氙弧灯或高压水银弧光灯,但这些光源和它们的电源较贵,并且在使用中可能有一定的危险(参阅 1.2.4)。

**高压氙弧灯**是最有用的高强度可见光源,一般来说,发光电弧本身只有 1mm 宽 3mm 高,它实际上是个点光源。这种光源非常稳定,其寿命达 1000 h,它在可见光区域有着几乎不变的发射谱,只是在 400—500nm 附近有几个小峰(图 1-6)。

**高压水银弧光灯**不象氙灯,它产生一个在可见区的分立谱,该分立谱又叠加在一个较弱的连续谱上(图 1-6)。由于气体压力高(约 100 大气压),致使 254nm 的谱线被全部吸收,而在该波长上留下一个暗区,但在汞的任何其它发射波长



处并非如此。当人们希望得到高强度单色光而又不太讲究要用严格一定的波长时,这种光源配合干涉滤光片或单色仪是很有用的。由于实际上只有四条主要的汞线在 380nm 以上,因而限制了这种水银弧光灯作为可见光源的价值。高压水银弧光灯比氙弧灯难用,它们比较不稳定,并且由于水银通常装在一根  $2 \times 12\text{mm}$  的毛细管中,因而在每次点燃前必须小心调整水银的分布。另一个麻烦之处是水银弧光灯通常是水冷的,而氙弧灯是空气冷却的。高压水银弧光灯的寿命平均约 100 h,但也可能用到 200 h 或者寿命短到零(即这种灯可能完全不亮)。尽管有这些不大不小的缺点,这种灯仍然相当广泛地应用着,菲利浦公司生产最好用的光源,并供应合适的水套和电源,Oriel 公司提供各种灯室,这些灯室可以包括一套聚光透镜(参阅参考文献 6)。

中压水银弧光灯给出一个分立谱线的光谱,它在紫外和可见区都无连续谱。它们主要和单色仪一起使用,但强度比用高压光源所得到的强度低得多,对紫外工作有利的一点是它们同时给出 254nm 谱线和其它谱线。给出较大面积光源的中压水银蒸气灯可以从 Hanovia 公司获得,它们可用来作为浸没式光源照射化学溶液和细胞悬液(仍参阅参考文献 6)。

有人<sup>[7]</sup>已经描述过一种金属蒸气弧光灯,它给出非常高强度的光,而其光谱则类似于太阳的光谱。

单独的激光器对于大多数可见光区域的光生物学工作并非很有用(与光化学工作相反),然而,可用闪光灯或者另一个激光器激励的染料激光器却越来越流行起来,这种激光器激发各种染料(例如噁嗪、黄嘌呤素或香豆素)而发出某种单一波长(线宽 $\sim 0.1\text{nm}$ )的荧光。对远紫外染料,一种染料所发的激光可以在 10nm 带宽上“调谐”,对近紫外染料,这种“调谐”

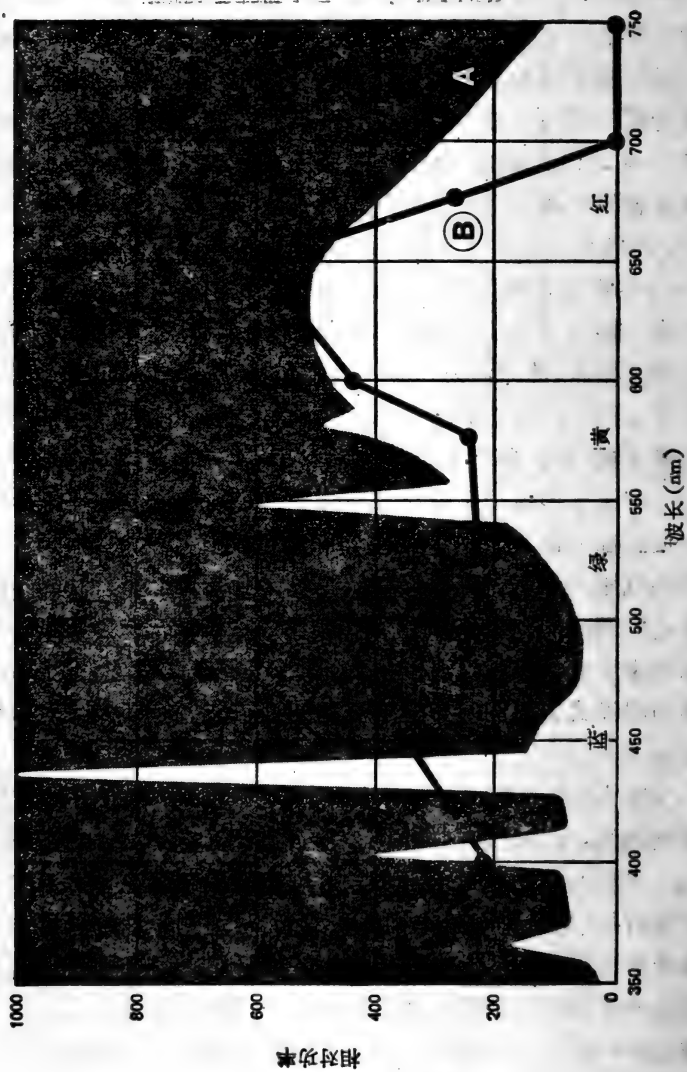


图 1-5 (A) 农用荧光灯的光谱输出与 (B) 使植物最佳生长的作用光谱(“饱和”)的比较。

的宽度是 20nm, 对可见光染料来说是 40nm。虽然用一个激光器就能得到很高的光强(例如在 694nm 处发光的红宝石激光器), 但是染料激光器一般给不出比用配备高压水银灯或氙弧灯的单色仪所能得到的强度更高的输出, 由于单色仪比较灵便和便宜, 因此染料激光器在实验光生物学上的用途仍然多少受到限制, 但是, 对于细胞的微束照射和光化学研究来说, 它们一直是非常有用的。

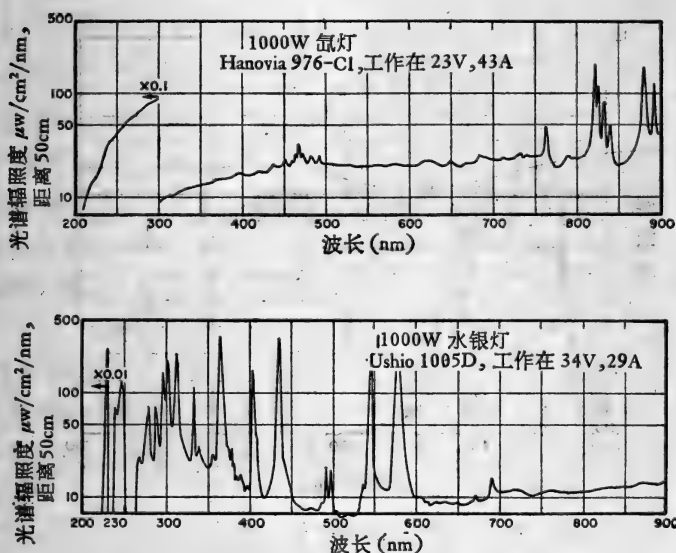


图 1-6 1000W 氙弧灯和水银弧光灯的光谱输出。

### 1.2.2 近紫外辐射

在近紫外区, 白炽灯效率很低, 一般不用它。

某些荧光灯(例如“日光”型, 图 1-3) 给出可用的近紫外输出, 但是强度低, 比较适合的灯是“黑-光”灯, 它们是一种具

有在近紫外区发光的磷光体的荧光灯(图 1-7)。常规的“黑光”(BL)灯有一些可见区的汞线,而“黑光-蓝”(BLB)灯有相当窄的光谱,它的线发射相对来讲很少。40W T12 BLB 灯在 355nm 左右有一个峰(15W BLB 灯的光谱略向长波方向位移,峰值在 366nm)。

高压水银弧光灯在近紫外区很有用,而氙灯则用途较少,这是因为它们的强度在 400nm 以下迅速下降(图 1-6)。

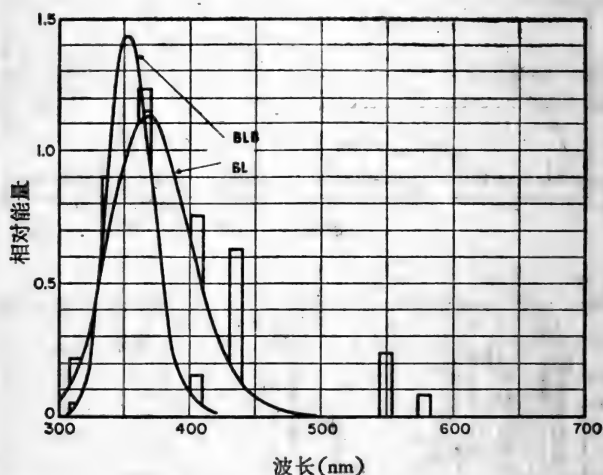


图 1-7 40W T12 黑光 (BL) 和黑光-蓝 (BLB) 灯 100 h 工作后的光谱输出。

一种在近紫外区有用的激光器是脉冲氮分子激光器,它在 337nm 处发光。这种激光器的输出是人们能由配备高压水银弧光灯的单色仪得到的输出的 10 倍左右,它的相对简单的设计和低廉的价格使这种激光器很具竞争力,某些厂家还为长波长的激光发射提供染料头(但是,用染料头时发光强度要低得多)。

### 1.2.3 远紫外辐射<sup>[1, 2]</sup>

只有两种光源通常用于远紫外区,它们是杀菌灯和高压水银弧光灯,前者事实上是 254nm 的单色光,后者在远紫外区发射某些中等强度的谱线(1.2.1)。必须记住,当工作在 300nm 以下时,人们实际上不得不用石英光学系统,这一点使得这个光谱区域的工作比较复杂和昂贵。

### 1.2.4 危害性

由于可见光和紫外线相对来讲容易获得,因此这两种辐射的危险往往被人忽视。虽然我们是千真万确地生活在一个“天然的”可见光的环境中,但是,一个人如果凝视太阳哪怕一分钟那么短的时间,就可能永久失明。高压水银弧光灯的亮度接近于太阳,在没有对眼睛加以防护的情况下直接目视这种光源,也将会造成类似的后果。

再者,280—330nm 区域的辐射对人的上皮组织是很有害的,它能造成皮肤癌和角膜角化病,280nm 以下的辐射在皮肤的死细胞层中大量被吸收,因此它对皮肤活细胞的危害不如波长稍长的辐射那么大。所以,除了对于像口唇和角膜之类的靠近表面的活细胞组织,黑光灯比杀菌灯更危险。

于是,人们必须考虑光生物学中所用光源的两个重要的危害:①很高强度的光对视网膜的损伤;②紫外辐射对皮肤、口唇和角膜的损伤。对极高强度光唯一好的防护是不要让人们受到照射,如果必须受照射,应该通过一块仅仅透射一个窄波带光的厚玻璃滤光片来看光源,这种滤光片最好是在离开光源最大强度值波长的某个区域。对致癌的紫外区的防护由厚玻璃提供,但一般不用塑料,虽然吸收紫外线的塑料是可以得到的。对正面来的紫外辐射眼镜可以很好地保护角膜,但

是人们必须注意从侧面射入的辐射。

最后,应该注意高压水银弧光灯和氙弧灯是工作在高电压下的,电流达几安培,如果操作者触电,那将可能是致命的。

### 1.3 光谱输出的窄化<sup>[1-4]</sup>

大多数光源给出很宽的光谱,在完成了最初步的生物实验以后,往往有必要把这个光谱尽量弄窄,以确定什么波长是最有效的,这样做有两个理由:①为了保证光源被最有效地用来产生某种效应(或者,当人们不希望产生这种效应时,可以避免某些波长);②为了得到与所研究效应有关的那些分子性质的某些信息,即获得作用光谱(参阅 1.5.4)。

正如在 1.1 中所指出的,在大多数生物学工作中并不需要带宽非常窄的光,这是因为与窄波带有关的效应是很少见的。权衡所需的吸收特异性和为产生大多数生物效应所需的高注量,5—10nm 的带宽是比较合适的。获得窄波带光的方法有:①单色光源;②滤光片或③单色仪。一般来讲,装置的价格和实验的难度也按上述顺序增加(激光器是个例外,它是昂贵的单色光源)。

#### 1.3.1 单色光源

利用单色光源显然是得到窄带辐射最容易的方法,但它是非常局限的,因为波长不能改变。

最好的单色光源是激光器,它一般给出宽度仅仅 0.01nm 的单一波长的光(虽然某些激光器,例如脉冲氮分子激光器产生若干波长接近的光),正如 1.1 中指出的,激光器对生物学工作之所以有用,是因为可以由它们得到很高的光强,而不是

它们极高的单色性。

杀菌灯发出的多达 85% 的光是汞的一条 254nm 的共振谱线, 因此使这种灯实际上成为一个单色光源。由于 BLB 黑光-蓝灯的光谱半高宽只有 40nm 左右, 所以实际上也可以把它看做是单色的(图 1-3)。

### 1.3.2 滤光片

滤光片提供了限制宽光谱的一种简便方法, 它们可以分为两类: 截止滤光片, 它让某一波长一侧的所有辐射通过, 而不让另一侧的光通过; 带通滤光片, 透射频带两侧的波长都不能通过它。

截止型的玻璃滤光片从紫外到可见区都可买到, 但是只有一种远紫外玻璃带通滤光片可以得到, 这种滤光片包括近紫外区 (Corning 9863 滤光片)。玻璃带通滤光片可以产生足够窄的带通, 虽然一般来说, 带通滤光片或者组合滤光片的峰值透射率越低, 其带通就越窄, 图 1-8 中给出某些具有高透射率的非常有用的玻璃滤光片的组合。

须知: 透明材料一般反射大约 4% 的人射到它们表面的辐射, 由于玻璃滤光片有两个表面, 估计有 8% 的透射光由于反射而损失, 这就解释了为什么玻璃滤光片的透射率曲线都在 92% 以下。还应该看到: 制造厂商的透射率曲线一般不可靠, 如果可能的话, 人们应该在分光光度计上检查市售滤光片的透射率。在远紫外区, 许多普通的材料都可用作很好的截止滤光片(图 1-9)。聚酯薄膜在 300nm 附近有一极为陡峭的截止区, 这个材料在生物学工作中是非常有用的, 它可以滤掉被蛋白质和核酸吸收的钝化波长。

化学滤光片, 水溶液往往可以相当有效地作为带通滤光片<sup>[8-9]</sup>, 在紫外区最有用的两个化学滤光片是硫酸铜水溶液

(最大透射率处的半高宽 $\sim 330-550\text{nm}$ )和镍-钴硫酸盐溶液(最大透射率处的半高宽 $\sim 235-330\text{nm}$ )<sup>[1]</sup>。化学滤光片通常是红外辐射很好的吸收体,因为10厘米的水将实际上吸收 $1200\text{nm}$ 以上的所有辐射。大多数化学滤光片的主要问题是它们会由于照射而迅速分解。化学滤光片和玻璃滤光片的组合也是很有用的。

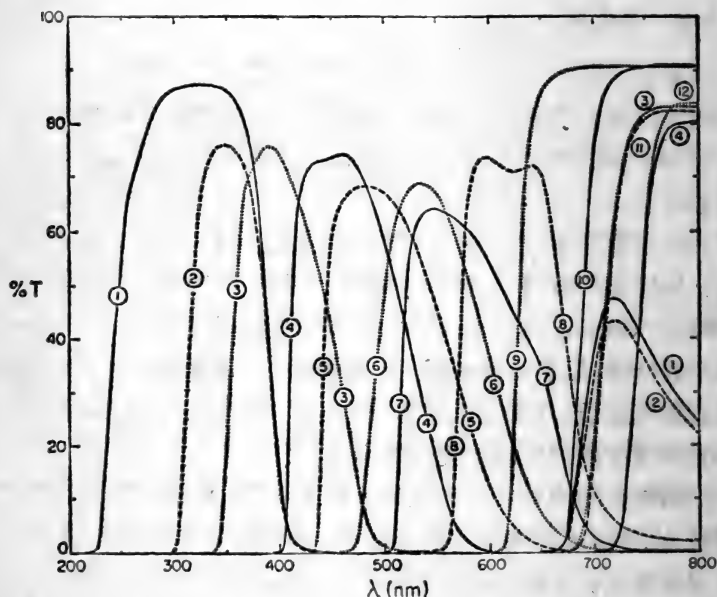


图 1-8 某些高透射率的组合玻璃滤光片的百分透射率。(1) Corning 9863; (2) Corning 9863 + 0169; (3) Kodak Wratten 39 + Corning 7380; (4) Corning 5031 + 3391; (5) Schott BG-14 + Corning 9788 + 3387; (6) Corning 9788 + 3385; (7) Schott BG - 38 + kodak 红外截止型 No. 301 + Corning 3486; (8) Kodak No. 301 + Corning 3480; (9) SchottRG 630; (10) Schott RG 695; (11) Kodak 39 + Schott RG 695; (12) Corning 5031 + Schott RG 695。

干涉滤光片是在没有单色仪的情况下可以得到的最好的带通滤光片,它们不便宜,但六个或八个一套的这种滤光片还



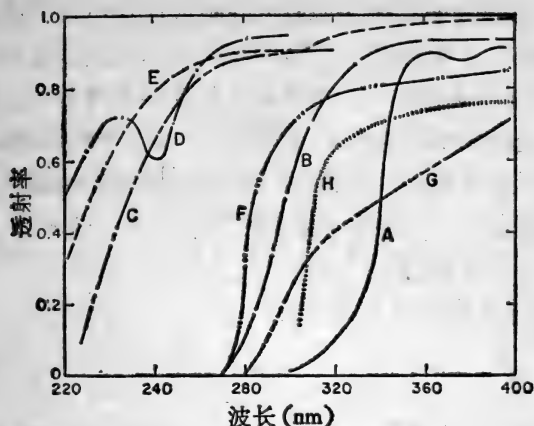


图 1-9 可作为紫外区截止滤光片的某些普通材料的透射率(还可以参阅参考文献 1 的附录 A)。(A) 窗玻璃, 2.5mm; (B) Pyrex 玻璃#774, 1mm; (C) Pyrex 玻璃# 9741, 1mm; (D) 光亮的熔石英; (E) 蒸馏水, 15cm; (F) 未处理的聚苯乙烯薄膜, 0.17mm; (G) 在距 S-1 灯 1.5m 处受照 150 小时后的聚苯乙烯薄膜, 0.17mm; (H) 聚酯膜 (50A), 0.13mm。

是比好的单色仪便宜得多。在干涉滤光片中, 光线在两个靠得非常近的半透明表面之间多次反射, 使所需波长的光经多次反射穿过滤光片时的位相与其直接透过滤光片时同位相, 于是, 该所需的波长直接通过滤光片, 而其它的波长则被破坏性干涉而以各个角度射出滤光片, 虽然可以得到很窄的带宽(窄到 5—10nm), 但是和玻璃滤光片一样, 其峰值透射率随着带宽的减小而降低。干涉滤光片有一个额外的优点, 即它们很容易使用(与单色仪相比), 且它们的特性不随使用而明显变化(塑料和化学滤光片就不是这样)。

中性滤光片提供了一种减弱光束强度而又不改变它的光谱成分或几何关系的最好途径, 在可见或紫外区都可以得到这种滤光片, 它可以把光强减小 50%—99%。改变光束强度

的其它方法(例如使光源远移样品或改变单色仪的狭缝宽度)往往将改变光束的几何关系和光谱成分,因此是不太希望的。(光注量率按与点光源的距离的反平方降低,但是,如果距离比光源长度的两倍大得多的话,像荧光灯那样的线光源将近似于点光源。)用丝网屏可制成不错的中性滤光片,但它们在样品上产生可能不希望有的强度变化。Oriel 公司制造一种可变中性滤光片,虽然它的价格比半打单一的滤光片还要贵,但是使用起来灵活方便。

### 1.3.3 单色仪<sup>[1, 4, 10]</sup>

在不同的光谱区给出窄频带光的最方便和最精致的方法是,使用衍射光栅单色仪或稜镜单色仪,这也往往是最昂贵和难度最大的途径。

单色仪都有一个色散部件,通常是一个稜镜或者一块衍射光栅,它们把白光束分解成它的彩色成分(图 1-10)。转动色散部件,就能使不同颜色的光落在单色仪的出射狭缝上。单色仪的一个重要指标是出射狭缝上的线色散倒数,它指出对给定狭缝宽度我们所能得到的波长间隔。单色仪的狭缝宽度一般调在 1—5mm,而典型的线色散倒数为 3nm/mm。单色仪传输的光通量是色散部件面积的函数,因此,所有高功率单色仪都有较大的稜镜或衍射光栅。对于入射狭缝至色散部件的距离与色散部件至出射狭缝的距离相同的单色仪(这是通常的情况,但不是图 1-10 所示的情况),如果单色仪受到最佳照明并且光源发出连续谱的话,狭缝宽度(入射狭缝和出射狭缝)加倍将使带宽加倍和传输功率增加 3 倍。

稜镜单色仪是经典型式的单色仪,但它们有很多不足之处。它们一般包含一些透镜,这些透镜的焦距随波长而变,这就意味着对每一个所用的波长,单色仪内的所有透镜以及稜

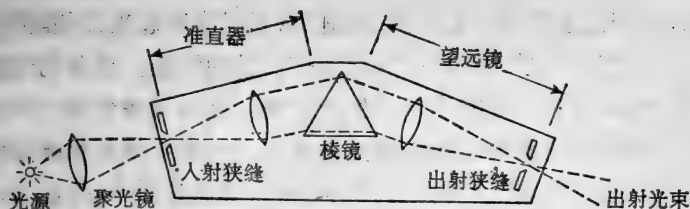


图 1-10 棱镜单色仪的示意图。在该所示仪器中，准直透镜的焦距比望远透镜的短。

镜都必须调整到一个新的位置，其次，线色散作为波长的函数急剧变化。

具有反射光学系统(其焦距与波长无关)的法线入射的光栅单色仪是对生物学工作最有用的仪器。当波长改变时这类单色仪都不需进行内部的调节(除旋转衍射光栅外)，而线色散实际上不随波长而变。这种仪器中最好的一种是 Bausch 和 Lomb 公司的 33-86-45-49 型单色仪，它有一块 1200 线/mm (线色散倒数小的)  $10 \times 10$  cm 的光栅(高传输功率)，与高压水银弧光灯或高压氙灯配合使用，它能以窄的带宽传输很高的功率(应该指出的是：所谓“高强度”Bausch 和 Lomb 单色仪实际上给出的功率传输率比这种仪器要低)。

高强度单色仪往往是相当贵的，应该只用在不能使用简单装置的情况，可以买到若干比较便宜的中等功率的单色仪<sup>[6]</sup>。

操作任何单色仪都要仔细，应该避免不必要的光进入单色仪；这就意味着在光源和单色仪入射狭缝之间使用滤光片或者一个稜镜，并保持单色仪的快门(它放在入射狭缝的前方)尽可能是关闭的。大多数单色仪都在出射狭缝处有一透镜，以便把色散部件的像聚焦在出射狭缝后面的某一平面上。这个像上的光应该有均匀的强度；如果不是这样的话，就应该调整光学系统，因为光场的不均匀说明单色仪没有被最佳照明。最

后,人们必须懂得:如果把单色仪密封或者罩起来以便防尘,那么它们的光学元件将能长期保持自己的性能。烟草的烟雾会很快在光学元件的表面产生一层膜,这层膜将会减小传输率,特别是在紫外层。高强度水冷光源的光学部分可能逐渐出现一些矿物质沉积物,它们也将大大降低透射率,为此可用温和的酸洗来除掉这些沉积物。

## 1.4 辐射能量的测量<sup>[1-4]</sup>

### 1.4.1 名词术语<sup>[1, 11]</sup>

除了在这本书中所用的国际制单位(表 1-1)外,我们还用了各种剂量学的术语。

最常用的剂量学术语是能量注量( $F$ ),它是穿过与光传播方向垂直的单位面积的能量<sup>1)</sup>,按国际制单位概念,它以“J/m<sup>2</sup>(焦耳每平方米)”度量,过去曾广为使用单位“erg/mm<sup>2</sup>(尔格每平方毫米)”,现在不提倡使用这个单位( $1\text{J/m}^2 = 10\text{ erg/mm}^2$ )。

能量注量率是通过与传播方向垂直的单位面积的功率,或是单位时间通过单位面积的能量( $\text{Jm}^{-2}\text{ s}^{-1} = \text{Wm}^{-2}$ )。

如果光的量以光子数表示,则可用光子注量和光子注量率表示,提醒读者注意光子的能量( $E$ ,以 J 表示)由下式给出:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

---

1) 注量这个术语(它最开始是由国际辐射单位与测量委员会为电离辐射定义的)一直遭到很多人的非议,因为它的拉丁词根(fluens = 流)看来有能量通过的时间速率之意,而不是累计通过的能量的意思,因此在意指单位面积的通量的情况下使用这个术语也许有碍于找到一个更好的名称。遗憾的是目前对这个量还没有一个国际一致同意的名称,但是读者应该经常注意该名词术语今后可能的改变。老的文献用“ $D$ ”代表“剂量”(参阅参考文献 11)。

式中  $h$  是普朗克常数 ( $6.624 \times 10^{-34} \text{Js}$ ),  $\nu$  是频率 ( $\text{s}^{-1}$ ),  $\lambda$  是波长 ( $\text{m}$ ),  $c$  是光速 ( $3 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$ )。

术语吸收剂量和吸收剂量率分别指受照射物体吸收的能量和功率,虽然这两个术语在电离辐射中是很常用的,但它们在光生物学中却很少使用<sup>[4]</sup>。

所有上述术语都是针对受照射的物体的,另外一些术语与光源有关。光源的强度是每单位立体角发射的功率,而光源的辐射度是光源每单位面积的强度,亮度是以人类视觉灵敏度表示的辐射度,因此,1000W的灯泡(乳白灯泡)很强但不很亮(或辐射度不高),而闪光灯泡的灯丝很亮却不很强。为了提供必须聚焦在单色仪入射狭缝上的小光源像,需要高辐射度的光源,在光生物学工作中为给出通常所需大的光注量,一般需要高强度的光源。

#### 1.4.2 热电堆<sup>[6]</sup>

热电堆(通常为 4 至 12 个热电偶串联)是测量紫外、可见或近红外辐射最基本的器件。在某种意义上讲,所有其它的辐射能量测量系统都是用热电堆校准的。当两种不同金属组成一个回路时,两个接点的任何一个上都存在一个接触电势(电压),如果两个接点处在相同的温度,则两个电势大小相等方向相反,无电流流过。然而,如果其中的一个接点用碳黑覆盖并且受到光照,则碳黑吸收所有的人射辐射,并把它们转换成热。这就引起这个接点的温度升高,从而增加了这个接点上的电压,导致电流流过该回路,这样一个回路就叫做热电偶。热电堆包含若干热电偶,隔一相邻的半数接点受光照,而另一半则蔽光,由于产生的电压是很低的(0.1 微伏的量级),所以必须用非常灵敏的微伏计进行测量。

热电堆测量平行光束里的注量率。如果光束是高度会聚

或者高度发散的,并且比热电堆的表面积大得多的话,则会引入一个与入射角的余弦成正比的误差,这是由于注量包含着所有穿过与光束传播方向相垂直的单位面积的光线。

热电堆比较容易受热的影响,它们可测出任何热源,所以人必须注意不要在使用过程中离热电堆太近,或者让其它热源靠近。尽管有这些缺点,热电堆还是经常用于常规的测量。它们最大的优点是响应不依赖于波长,而这就是为什么用它们作为校准其他所有测量器件的标准的道理。单色仪的输出经常是小的光束,并且可能在不同的场合下有很不相同的带宽,在测量单色仪的输出方面,热电堆特别有用。

热电堆刻度对剂量绝对测量是很重要的,这种刻度可以用美国国家标准局建立的 50W 经典碳灯丝标准灯来进行,但是对于大多数用高注量率的光生物学工作来说,最好用新的标准灯,例如 1000W 钨丝灯。Eppley 公司出售这两种灯泡并附有完整的使用说明。刻度工作应该非常仔细,在正常使用时应该每三年重新刻度一次。

黄泉仪器公司<sup>[6]</sup>生产一种完备的辐射计测量系统,它由一个斩波放大器和一个小型热敏电阻探头组成(热敏电阻是一种其电阻对温度非常敏感的半导体),这种系统价值几百美元,它稍不如热电堆灵敏,但由于它的探头小 ( $0.9 \times 1.2 \times 3.8\text{cm}$ ),所以可以用在空间狭窄的地方。

### 1.4.3 光电器件

光伏打电池成为对于诸如杀菌灯或荧光灯等特殊光源的非常灵巧的剂量计。在像硒势垒层类型的光伏打电池中,光射在镀金属的半导体上,使电子从半导体中释放出来而进入金属镀层,于是通过与半导体的另一面连接的外回路建立一个电流。这种器件是完全自身供电的,在通常的光通量下,

它可产生足以驱动微安表的电流,像所有的电子器件一样,对每一种光源或每一种测量的波长,光伏打电池都必须用热电堆校准。Jagger<sup>[12]</sup>描述了一种用 Corning 7-54 滤光片覆盖的光伏打电池,它已用于紫外区的测量。

光电管是一种真空电子管,它的阴极上涂了一层发射光电子的金属,例如铯。当光射在阴极上时,电子发射出来,然后被电场向阳极加速,从而在一个连接阳极和阴极的外回路中产生电流,然后可以对此电流进行电子学放大。对于用单色仪时经常遇到的低注量率情况,光电管的输出太小,不能用通常方法放大,这时必须使用光电倍增管。

光电倍增管在自身管子内就产生大多数情况下所需要的放大。除光阴极外,光电倍增管还有几个(通常是 5—10 个)阳极-阴极(联极)。阴极发射的电子由电压梯度向第一联极加速,在第一联极上每一个轰击的电子将引起几个电子的发射,发射出来的电子又通过电场打到第二联极上,这样依次类推地进行下去。用一个 10 级的光电倍增管得到  $10^6$  的放大倍数是常见的,对于 300nm 以下的应用,光电管和光电倍增管都应该有石英窗。

虽然热电堆是我们能用的最精确的检测器,但它们比较娇脆和对温度敏感,并且进行一次测量可能要几分钟。光电倍增管比较坚固和容易使用,测量可以进行得很快,但是对每一个所测的波长都必须对光电倍增管加以校准。

#### 1.4.4 化学测量系统(光化计)和生物测量系统

上面讨论的那些物理器件通常测量平行光束里的注量率,化学系统和生物系统也能做到这一点,但它们还能直接测量样品内的平均注量,而不管光束是发散的还是会聚的,只要剂量计溶液具有和实验样品相同的光吸收。在注量率有波

动、辐射场不均匀、样品几何形状不规则或者几何参数随时间改变(例如由于取样的缘故)的场合,化学和生物剂量计特别有用。

**光化计测量**是一种通过在化学溶液里(通常是水溶液)产生的变化测量光的方法。如果用一种吸收辐射非常有效的光化计溶液(例如在溶液的外周 1 毫米层中即能有效地吸收掉光),则我们测出样品表面的注量,然后把这个注量除以时间即可迅速转换为注量率。另一方面,大多数生物样品可透射大部分入射在照射池上的光,而我们可以选择光化计的浓度以使光化计的吸收等于样品的吸收,这样我们可以测量出每一个生物细胞所接受的注量,并不难再转换成每一个细胞的注量率。对紫外工作最好的液体光化计是草酸铁钾光化计,它的优点是:①这种光化计溶液在整个紫外区吸收光;②量子产额(参阅 1.5.2)实际上是常数;③量子产额与注量率无关,并且事实上不依赖于温度;④量子产额不强烈依赖于溶液的成分。草酸铁钾光化计的制备必须在红光或黄光下进行,这是由于它的敏感范围进入了可见区。用作光化计的纯化的草酸铁钾晶体可从 Duke Standards 公司<sup>[6]</sup>买到。

用于可见波段的液相光化计通常是测量染料溶液所消耗的氧,有时使用卟啉。含脱镁叶绿素和含脱镁叶绿环类的光化计在 440 — 640nm 范围内具有与波长无关的量子产额,应用这些体系的困难之一在于保持氧气的饱和<sup>[4]</sup>。

**生物剂量测量**可能相对来讲容易和比较准确,与用化学光化计一样,高吸收悬液将给出样品表面上注量的测量,而透明悬液将给出单个细胞上的注量而不论光束的几何形状如何。对紫外工作比较好的材料是噬菌体,特别是那些呈指数钝化特性的噬菌体,在指数钝化下,注量正比于噬菌体百分存活率的对数。虽然不同实验室的工作者常常得到不同的结



果,但是在同一个实验室里,在相同的条件下利用一定的噬菌体和一定的宿主经常给出重复性很好的结果,当然,这种系统也必须加以刻度。生物剂量测量有一个任何其它测量系统所没有的优点,这就是生物剂量计常常可以与进行研究的生物样品混合在一起,两者同时受照射;这就能高度准确地测量投射在悬液中每个细胞上的平均注量。

#### 1.4.5 一个细胞所“看到的”注量

当我们照射单层细胞时,很容易确定被每一个细胞所“看到的”注量率,它就是这些细胞表面上的注量率。然而,细胞液体悬浮液可以吸收一定量的光,于是靠近照射池后部的细胞就比那些靠前面的细胞少接受一些辐射。即使大力搅拌样品,每一细胞上的平均注量率也将低于照射池前表面上的注量率,这个效应可以按照 Morowitz 设计的步骤进行修正(表 1-2)。

人们一定不要忘记照射池前壁的前表面将一般反射掉大约 4% 的入射辐射,然而它的后表面却反射很少,这是因为水的折射率接近于玻璃。如果我们在盛满水的照射池后面进行测量,则只要计及两个表面上的反射损失。如果照射池是空的,那么在四个表面上将都有反射损失。

最后,在估计射在单个细胞上的注量时,像细菌那样的小细胞悬液的光散射可能引起很大误差。例如, Morowitz 修正取决于悬液光密度的测量,但是,如果用普通的分光光度计来做的话,就可能有 10 倍之大的误差,这是因为样品的大部分表观吸收是由样品对光的散射造成的,而这种散射是如此之大,以至它们完全进不到光接收器中。对这个效应可以进行修正<sup>[14]</sup>。

表 1-2 对浓悬浮液中非散射颗粒的入射能量的修正<sup>[15]</sup>

透 射 率 (%)	光 密 度	修 正 因 子 <sup>a</sup>
100	0	1.0
90	0.046	0.95
80	0.097	0.90
70	0.155	0.84
60	0.222	0.78
50	0.301	0.72
40	0.398	0.66
30	0.523	0.58
20	0.699	0.50
10	1.00	0.39
5	1.301	0.32

a. 对进入样品的能量所用的这些修正因子给出在大力搅拌的条件下射在样品中每个颗粒上的平均能量，人们还必须考虑由照射池前壁引起的表观吸收，表中的数值如何用于散射的细菌悬液，请参阅文献 14。

## 1.5 实验方法<sup>[1,15]</sup>

### 1.5.1 样品的吸收

在全部光生物学中，光被生物系统的吸收是基本的事件，只有光子被吸收才产生化学的(和随之而来的生物的)效应。吸收的光子使分子或分子的一部分(发色团)上的价电子上升到激发态，于是整个分子和那个价电子两者都视为被激发了。激发的分子也可以由几种途径损失能量而返回基态，这些途径主要是：①把电子激发能转变成该分子本身或其它分子的振动能(热)；②发射一个光子(荧光或磷光)，或③产生一个化学反应。在通常的生物系统(室温下，液态)中，大部分吸收的能量变成热，其中的一部分作为荧光或磷光，而相当少的一些以化学反应消耗掉。化学反应可能涉及到吸收分子的重排而变为一个新的稳定形式，或者也可以涉及到能量(电子的或振

动的)从一个分子到另一个分子的传递,受体分子然后在结构上发生某些变化(进一步的细节在第2章和第3章里给出)。

虽然看起来是很明显的事情,但某些人却未考虑他们的生物材料的吸收特性。例如,如果希望产生一个胡萝卜素可能起媒介作用的效应,那就不要用低瓦数的白炽灯,因为这种灯发出的大部分辐射在胡萝卜素不吸收的红区和红外区;这种情况下蓝光将更为有效。

在估计一个细胞或它的一部分所接受的注量时,吸收的影响变得非常重要,如果我们遇到的是浓悬浮液,则靠近表面的细胞的吸收可能使很多光被屏蔽而照不到靠照射池后面的细胞,这就是为什么在照射期间要尽可能搅拌细胞悬液的缘故。然而,虽然搅拌可保证每一个细胞接受相同的平均注量,但是如果悬液吸收很大的话,这个平均注量将低于入射在照射池上的注量;在这种情况下,如果我们知道样品的光密度,就能计算出这个平均注量(参阅1.4.5和表1-2)。如果照射的是一个像昆虫卵之类的大的生物体,情况将更为严重,这时由于这种细胞表层的过度屏蔽,光甚至可能达不到所希望的靶子(例如DNA)。

吸收问题在蛋白质和核酸吸收很强的远紫外区更为严重,细菌细胞(例如大肠杆菌)的直径只有 $1\mu\text{m}$ 左右,它在 $254\text{nm}$ 处吸收大约25%的辐射。在较厚的组织里, $254\text{nm}$ 的辐射在通过 $10\mu\text{m}$ 的组织后其强度可以减弱到起始值的10%,于是,在远紫外区往往只用小的微生物进行实验,用任何比酵母细胞更大的细胞进行实验都需要更精巧复杂的手段,并且可能得到难于分析的结果。

在近紫外和可见区,由于蛋白质和核酸吸收很少,吸收的问题不大。近紫外和可见区的吸收特性随生物的不同变化很大, $350\text{nm}$ 以上,大肠杆菌几乎是透明的,但是和大肠杆菌一

样小的蓝绿藻却有强烈吸收。关于在近紫外和可见区会遇到的吸收，我们可以归纳出以下几个一般的规律：①有光合作用能力的生物总是有大量的叶绿素和胡萝卜素，并可能有很多有关的光合作用色素，例如叶黄素或藻胆色素，因此可以预期它们在这整个区域有强烈的吸收；②一切具有需氧代谢的生物将有中等浓度的细胞色素(在紫区和红区吸收)、黄素(吸收在 500nm 以下)和醌(吸收在 400nm 以下)；③很多其它强烈吸收的分子，像维生素，由于它们通常的浓度很低，所以一般不太重要；④动物细胞通常是比较透明的，而植物细胞在这整个光谱区则往往是不透明的。

光散射可能严重影响吸收谱的测量和样品深部平均注量的估算。由于随着波长的增加散射减小(对细菌，散射随波长的一次方或二次方的倒数变化)，因此散射对紫外区测量的干扰大大超过在用红光的情况。散射对吸收谱的影响可以用各种方法减小<sup>[1]</sup>，最有效的方法是应用一种这样的分光光度计(例如 Aminco-Chance Duochromator)：它有一个大端窗的光电倍增管，光电倍增管放得很靠近样品池，于是光电倍增管能截获大部分散射的辐射。然而在一般的分光光度计中，光电管截获的散射辐射很少，于是，虽然大肠杆菌在 500nm 处的吸收可以忽略，但是如果在分光光度计上测量几乎是完全由散射造成的“混浊度”时，却可以非常有效地观察大肠杆菌的生长。散射对估算样品内平均注量的影响已经在 1.4.5 中讨论过了。

如果我们要测定作用光谱(参阅 1.5.4)，生物系统的吸收就更为重要。

### 1.5.2 存活曲线

光生物学家研究的许多生物效应都涉及到细胞、亚细胞

水平的细胞器、某一种生物特性或生物分子的钝化,这种钝化过程可以用“存活曲线”来分析,存活曲线一般是以对数纵座标表示存活率而以线性横座标表示注量所画出的(例如,参看图 5-12)。在这种图上,一条斜率为负的直线说明活性颗粒(分子、细胞器或细胞)数目( $N$ )随注量( $F$ )的减少率正比于( $k$ )在该注量水平残存的活性颗粒数:

$$-dN/dF = kN \quad \text{或} \quad N/N_0 = e^{-kF}$$

这个指数钝化关系就是熟知的一次击中动力学,它表示一个光子就能(虽然往往并不成功)钝化一个生物颗粒。在 37% 的存活率下,  $kF = 1$ , 这表示每个颗粒平均被“击中”一次,这个活存率下的注量叫做  $F_{37}$ , 它是一个表征钝化速率的很有用的参数。人们一直在用 Clayton<sup>[15]</sup> 提出的一种简单而优雅的形式处理存活曲线动力学或靶子理论。

对于一个事件的量子产额( $\phi$ )定义为:

$$\phi = \frac{\text{事件数}}{\text{吸收的光子数}}$$

除非是链式反应,否则量子产额总是  $\leq 1$ , 它代表着一个被吸收的光子产生一个诸如钝化一个分子或细胞那样的所感兴趣的事件的几率,酶钝化的典型量子产额是 0.01, 它表示一个酶分子在吸收 100 个光子后才被钝化,但是,必须懂得这些光子中只有一个做了这全部的钝化工作,这一点反映在对大多数酶的一次击中钝化动力学上。

人们必须注意  $\phi$  是以吸收的光子数而不是入射光子的数目定义的,它是一个通常可以测量的量。其次,由于光子才是起作用的实体,所以用焦耳/米<sup>2</sup> 表示的注量必须转换成光子数/米<sup>2</sup>。量子产额可以随波长、温度或各种其它参数改变。

光敏感性可定义为:

$$\sigma = \frac{\text{事件的数目}}{\text{入射光子的数目}}$$

式中  $\sigma$  叫做“钝化截面”。“吸收截面”可以类似地定义为:

$$s = \frac{\text{吸收的光子数}}{\text{入射的光子数}}$$

$s = 3.82 \times 10^{-21} \epsilon$ , 式中  $\epsilon$  是以  $(1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$  (升摩尔<sup>-1</sup>厘米<sup>-1</sup>) 度量的摩尔消光系数, 显然, 光敏感性或者说一个系统的真正光敏感性是它的吸收截面和量子产额的乘积:

$$\sigma = s\Phi$$

准确的存活曲线只有在样品吸收很少一点入射光的条件下才能得到。不难看到, 一个在低浓度下指数钝化的不搅拌的样品在高浓度下将呈现一个中凹向上的曲线; 靠近照射池后部的细胞将接受比较少的人射辐射, 因而将钝化的较慢, 因此, 钝化曲线在开始部分反映出迅速的钝化, 然后逐渐地越来越慢。如果迅速搅拌悬液, 将观察到指数钝化, 但是由于平均注量低, 斜率将比低浓度下的小。由于同样的道理, 最理想的办法是把细胞悬液放在不吸收入射光的介质中进行照射 (例如, 对于紫外区, 用磷酸缓冲液或生理盐水)。

### 1.5.3 紫外恢复现象

生物系统在紫外线照射后的处理情况可能大大影响它的效应, 因为照后的条件可以或者助长或者抑制细胞里一些修复紫外线引起的 DNA 损伤的系统。这种恢复效应在被近紫外辐射和可见辐射钝化后似乎起不了多大作用, 因此这里只讨论紫外的钝化, 这些修复现象和它们的机制在第 5 章里再详细讨论。

光复活作用是通常由 300—500nm 范围内的辐射起媒介作用的远紫外辐射损伤后的恢复。只有当紫外照射的细胞放

在阳光充裕的房间里，或者让这种生物系统在家用荧光灯下曝光 1 个半小时以上，不想要的光复活作用才往往是一个严重的问题。某些紫外工作者为了避免不希望的细菌光复活，用“金”荧光灯装备他们的实验室，这种灯只发射 500nm 以上的光。

紫外损伤的暗修复至少有两种机制（参阅 5.4.2），其一（切除-再合成修复）主要发生在 DNA 复制之前，而另一种机制（复制后修复）则发生在 DNA 复制之后。如果细胞在照后保持在欠最佳的生长基里 1 或 2 小时，切除-再合成修复变得更有效；这样造成的恢复叫做液体支持的修复（liquid-holding recovery）。照射后立即把细胞接种或培养在全组分生长基里可以避免这种情况。必须认识到正常情况下都有大量的暗修复，即使立即培养也是如此，这里指出的谨慎仔细的措施的唯一目的仅在于防止可能使实验结果改变的额外的修复。

某些细菌株缺少这两种暗修复机制，因此对紫外辐射特别敏感（参阅图 5-12），这些菌种非常敏感，甚至室内荧光灯光里所含的少量 313nm 的辐射都能在几分钟内使它们钝化，一个由此而来的危险是这种钝化将很快选择出该菌种中抵抗力强的细胞，而造成敏感菌株的丧失。

看起来很奇怪的是大量的修复现象似乎主要对于紫外辐射引起的损伤才发生，这无疑是由于紫外线引起的损伤通常发生在 DNA 上，DNA 是一个特殊的分子，它由许多基因组成，这些基因通过 DNA 分子的复制保持下去，因而 DNA 的损失或损伤可以引起细胞死亡。相反地，对近紫外和可见光而言的靶子通常以很多分子的形式存在于细胞中，它们可以由细胞的进一步新陈代谢而得到替换，于是用不着修复。近紫外和可见光也能损伤 DNA，但是它是在低的效率下以间接的机制发生的（参阅第 4 章和 15.7.1）。

### 1.5.4 作用光谱<sup>[1,15]</sup>

作用光谱(参阅 3.7)是为产生一个给定的效应所需的人射光子数的倒数对波长的图(即光敏感性= $\phi$ 的图)。作用光谱上的峰代表最有效的波长,这些波长只需较少的人射光子就能产生这种效应。由于光子的能量通常比产生一个给定化学效应所必须的多得多,因此不同能量的电子激发往往将产生相同的效应,例如,虽然紫光的光子能量是红光的两倍,并且一开始产生不同的电子激发,但叶绿素吸收红光或紫光的光子都产生光合作用。于是,对某种效应的作用光谱往往类似于吸收引起这种效应的辐射的分子(发色团)的吸收光谱。

为了在作用光谱和吸收光谱之间得到较好的匹配,需要满足很多条件,这些条件包括:

(1) 注量-效应曲线应该在全部波长上相似(如果注量乘上一个常数因子,效应是可叠加的),这意味着作用的机制在所有波长上是相同的。

(2) 量子产额应该在所有波长上相同。

(3) 发色团的吸收光谱在体外和体内两种情况下必须相同。

(4) 在细胞里被发色团前方的非活性物质(细胞内屏蔽)散射的光必须要么可以忽略,要么在所有波长上保持不变。

(5) 样品在任何一个感兴趣的波长上都不应该吸收掉大部分辐射。

(6) 在所测量的条件下必须满足时间和注量率的反比关系(例如,若时间加倍而注量率减半,则效应应该相同)。

由于作用光谱是以光子的效率为基础的,所以必须进行“量子校正”,这种校正可以很容易地做,即把在某一给定波长上所需的能量注量乘以这个波长与任一参考波长的比值,这



是因为光子的能量反比于波长(参阅 1.4.1)。

必须懂得作用光谱代表着一个生物系统在一组给定条件下的响应,在不同的条件下可能得到不同的光谱。因此,在描述一个作用光谱时,人们必须说明是什么生物机体、什么效应和什么条件。例如,人们可以说“室温下在叶绿素中光合作用的作用光谱”,而不可说“对光合作用的作用光谱”。

作用光谱一直是光生物学中十分有用的工具,这个技术在鉴定光合作用发色团方面<sup>[16]</sup>已经用了一个世纪左右,早在 Avery 及其同事关于转化原理的实验的前十年,作用光谱就对生物系统中 DNA 的重要的遗传作用提供了强有力的证据。

(沈 恂译)

## 第2章 光谱学

Angelo A. Lamola

(贝尔实验室)

Nicholas J. Turro

(哥伦比亚大学化学系)

2.1	序言 .....	35
2.2	预备知识: 电磁辐射和光的本质 .....	35
2.3	光的吸收 .....	38
2.3.1	经验规律 .....	38
2.3.2	吸收光谱和分光光度计 .....	39
2.3.3	吸收光谱和分子的结构 .....	41
2.3.4	吸收光谱和分子的电子状态 .....	42
2.3.5	分子的电子状态、轨道和能级 .....	43
2.3.6	电子状态之间的光学跃迁和光吸收的规则 .....	50
2.3.7	振动能级和吸收带宽 .....	53
2.4	电子激发态分子的弛豫路径和速率 .....	55
2.4.1	辐射弛豫, 荧光和磷光 .....	56
2.4.2	无辐射弛豫, 内转换和系统间渡越 .....	58
2.4.3	量子产额、寿命和弛豫过程的速率 .....	61
2.5	激发态分子的相互作用 .....	62
2.5.1	微环境的影响 .....	62
2.5.2	激发态分子的双分子反应 .....	63
2.5.3	双分子动力学, Stern-Volmer 猝灭 .....	64
2.6	激发态分子的探测 .....	65
2.6.1	发光光谱学 .....	65

2.6.2 闪光光解 .....	66
2.7 电子的能量传递 .....	67
2.7.1 理论 .....	67
2.7.2 唯象的分类 .....	71
2.7.3 溶液中双分子的激发传递 .....	72
2.7.4 生物系统中的电子能量传递 .....	72
2.8 练习 .....	75

## 2.1 序 言

光生物学的中心是 Grotthus 和 Draper 在 1818 年首先陈述的一个原理: 只有吸收了的光才能产生化学变化。于是, 分子光生物学关心的是从光被所考虑的生物系统的某一部分吸收开始到所观察到的某些生物反应为止的分子事件的顺序, 因此, 我们不仅应该, 而且必须从处理那些支配着分子吸收光的定律开始光生物学的课程。

光谱学指的是这样一门科学, 它起初只和定量测量光的谱分布有关, 但现在也包括许多解释这些测量结果所得到的知识。在我们看来, 可以把光谱学看成这样一门科学; 它所关心的是通过光的测量去了解光与分子系统的相互作用、各种激发态分子的结构和它们所发生的弛豫过程。

## 2.2 预备知识: 电磁辐射和光的本质

电磁辐射是一种可以在真空中传输的能量形式, 当它以足够的量存在时, 可以把它描述成横的电磁波, 即一系列彼此垂直和迅速交变的电场和磁场, 而这两个场又都垂直于传播的方向。作为一种波动, 这种辐射可以用它的波长  $\lambda$  和频

率  $\nu$  来表征, 波长和频率由下面的简单公式相联系:

$$\lambda \nu = c \quad (2-1)$$

式中  $c$  是传播速度 (光速), 数值为  $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ 。单一波长的电磁辐射叫做单色辐射。

电磁辐射按照各种波长范围进行分类, 分类的基础起先是经验的, 之所以要分类是因为对不同波长范围的辐射需要非常不同的方法去产生和探测, 表 2-1 给出了一种分类法。

通常所谓的光是一种引起人类视觉的辐射, 这种辐射处在 380—800nm 波长区间, 更确切地讲, 这一波长区间叫做电磁辐射谱的可见部分。光生物学主要关心波长从 200nm 到 800nm 的辐射, 这种辐射被分子吸收后能够引起化学上的变化。一般来讲, 波长较长的辐射效率低, 除非它非常强。波长很短的辐射一般来讲可以无例外地使分子电离, 它们属于电离辐射 (例如 X 和  $\gamma$  射线)。

表 2-1 电磁辐射谱

范 围	波 长
$\gamma$ 射 线	$10^{-4} - 10^{-1} \text{ nm}$
X 射 线	$10^{-2} - 10 \text{ nm}$
真 空 紫 外	$10 - 200 \text{ nm}$
紫 外	$200 - 300 \text{ nm}$
近 紫 外	$300 - 380 \text{ nm}$
可 见	$380 - 800 \text{ nm}$
红 外	$0.8 - 1000 \mu \text{m}$
微 波	$1 \text{ mm} - 100 \text{ cm}$

把光描述为一种电磁波不足以解释像分子吸收光和发射光之类的现象, 一个需要知道的重要概念是: 电磁辐射是量子化的, 也就是说, 它是由一些叫做光子的不连续的能量包组

成的。光的波动描述是为了解释涉及大量光子的现象，例如经典光学里的现象，然而，必须把光看成一个一个的光子，才能说清楚那些涉及其本身必须用量子理论来处理的系统（像分子）的现象。

爱因斯坦首先提出每个量子的能量由下式与辐射的波长和频率相联系：

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (2-2)$$

式中  $h$  是普朗克常数 ( $6.63 \times 10^{-34} \text{Js}$ )，于是，波长较长的光子能量较低。

1 摩尔的光子 ( $6 \times 10^{23}$  光子，有时叫做 1 爱因斯坦) 所含的能量则是  $6 \times 10^{23} hc\lambda^{-1}$ ，如果以 kcal/mol (千卡/摩尔) 为单位，则  $E = 2.86 \times 10^4 / \lambda(\text{nm})$  ( $1 \text{cal} = 4.184 \text{J}$ )。本章感兴趣的范围内各种波长光子的能量列于表 2-2，一个波长 700nm

表 2-2 紫外和可见光的光谱

$\lambda(\text{nm})$	$\nu(\text{s}^{-1})$	颜 色	能 量	
			kcal/mol	eV
200	$1.5 \times 10^{15}$	不可见紫外	143	6.2
250	$1.2 \times 10^{15}$	不可见紫外	114	4.9
300	$1.0 \times 10^{15}$	不可见紫外	102	4.4
380	$7.9 \times 10^{14}$	可见紫外边缘	76	3.3
400	$7.5 \times 10^{14}$	紫	72	3.1
470	$6.4 \times 10^{14}$	蓝	60	2.6
530	$5.8 \times 10^{14}$	绿	54	2.3
580	$5.2 \times 10^{14}$	黄	49	2.1
620	$4.9 \times 10^{14}$	橙	46	2.0
700	$4.3 \times 10^{14}$	红	41	1.8

的“红”光子具有的能量大约是一个波长 400nm 的“紫”光子的一半。例如，一个系统可以吸收紫光，但是对红光完全透明；另一个系统两种波长都可以吸收，如果是后一种情况的话，为了提供这个系统相等的能量，则必须吸收大约两倍于“紫”光子数的“红”光子，如果我们关心的是用太阳光加热的话，这可能是一个重要的考虑。然而在考虑一些光分子事件时，虽然光子的能量可能会决定光子是否被吸收，但是吸收的光子的能量对于以后所感兴趣的事件的发生也许并不重要，在这种情况下，光分子事件的数目正比于吸收的光子数，而不是正比于总的吸收的光能。从一开始就懂得这个区别是很重要的，另一点重要的是，人们应能由用能量测量器件(如热电堆)测量的光的强度换算成以光子数为基础的单位。

## 2.3 光的吸收<sup>[1-3]</sup>

### 2.3.1 经验规律

Bouguer (1729) 和 Lambert (1760) 发现：入射光被介质吸收的分额正比于它穿过的介质的厚度，而和光的强度无关，即：

$$-dI = aI dx \quad (2-3)$$

式中  $I$  是从进入介质算起某一距离处光的强度， $a$  是吸收系数(消光系数)。Bouguer-Lambert 定律成立的条件是：①入射光是单色的和准直的；②吸收介质是均匀的；③吸收中心的作用是彼此独立的。

对于吸收光的溶质在实际上透明的溶剂里的许多溶液，Beer (1852) 指出：吸收系数  $a$  正比于溶质的数目或浓度  $c$  (Beer 定律)。把这个关系代入 Bouguer-Lambert 定律，给出：

$$-dl = -acl dx \quad (2-4)$$

该式的积分给出:

$$\ln(I_0/I) = acx \quad (2-5)$$

式中  $I_0$  和  $I$  分别为入射光强度和透射光强度,  $x$  是吸收介质的厚度。对于溶液, 这个定律经常用以 10 为底的对数表示:

$$\log_{10}(I_0/I) = \epsilon cl \quad (2-6)$$

式中, 如果  $c$  是以  $\text{mole/l}$  表示的浓度,  $l$  是以  $\text{cm}$  表示的光程, 则以  $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  为单位的常数  $\epsilon$  叫做摩尔消光系数。公式 (2-7) 定义了吸收率  $A$ , 经常也叫做光密度 (O. D.):

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \text{O.D.} = -\log_{10} T \quad (2-7)$$

入射辐射透过的份额叫做透射率  $T$ 。

必须指出: 如果 Bouguer-Lambert 条件不满足的话, 则专指由于吸收使透射光减少的吸收率  $A$  就不完全等同于 O. D. 或  $-\log T$ , 就到达介质另一侧的探测器的人射光子变少而言, 入射光的反射和散射也会造成透射光的减少, 透射率 ( $T$ ) 和光密度 (O. D.) 由公式 (2-7) 定义时并没有特别说明透射强度减小的理由。

不符合 Beer 定律的情况是经常有的, 为此我们必须一般假定它不适用, 除非实验上能够证实它的成立。分子聚集态和络合, 部分的电离(分解)和其它一些与浓度有关的现象可能导致对 Lambert-Bouguer-Beer 定律的偏离。由于各种双光子过程和其它“非线性”效应的作用, 当涉及到从激光器获得的那样高的光强度时, 这个定律也往往被破坏。

### 2.3.2 吸收光谱和分光光度计<sup>[4,5]</sup>

吸收光谱可以用各种方法表示, 虽然没有任何标准的表示法, 但最一般的是把波长  $\lambda$  画在横坐标上, 而把吸收率画在纵坐标上, 课文中叙述了一个这样的范例(见图 2-1)。

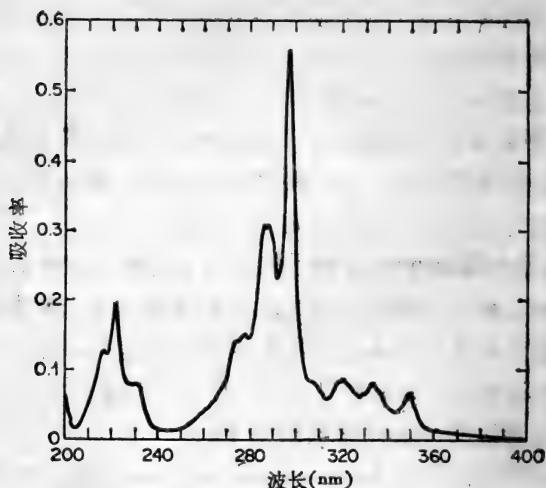


图 2-1 1,2,5,6-二苯蒽的吸收光谱。溶液的光程是 1cm, 二苯蒽的浓度为  $4\mu\text{M}$ , 于是, 在吸收最强的 297nm 处的摩尔消光系数是  $1.4 \times 10^5$ 。在 360nm 和 400nm 之间吸收很弱是对的, 它说明这时的摩尔消光系数在  $5 \times 10^2$  量级。在这个谱上至少可以看到 4 个跃迁, 它们代表从基态到 4 个激发单线态的跃迁 (参阅 2.3.5 和 2.3.6), 这些跃迁的起点分别在 400, 355, 300 和 235nm 附近。

选择波长作为一个参数是比较方便的, 因为光栅类型仪器使光谱对波长作线性色散, 当然, 能量随波长的增加而减小, 它正比于频率, 反比于波长。大多数仪器或者画出透射率 ( $I/I_0$ ), 或者画出光密度 [ $-\log(I_0/I)$ ], 当 Lambert-Bouguer-Beer 定律成立时, 光密度与吸收率相同, 最好是把纵坐标画为消光系数  $\epsilon$ , 当  $\epsilon$  (或  $A$ ) 变化范围很大时, 纵坐标经常画成  $\log \epsilon$  (或  $\log A$ )。

吸收光谱的测量包括取得一系列紧密相间的波长上的  $I$  和  $I_0$  的数值, 理想情况下可以用一个吸收为零的参考样品得到  $I_0$ , 这个参考样品除了不含所研究的吸收物质外, 其余完



全与待测样品相同。双光束分光光度计可以自动扫描和记录光谱,在这种仪器(现在它们是最常用的)里,光从一个连续谱(在该范围内的所有波长都存在)的光源发出,准直并分成两束,其中一束通过样品,而另一束通过参考样品,这两束光或者在穿过样品之前或者在穿过之后被单色化,利用某些光电探测器(如光电倍增管)把光束的强度转变成电信号,然后经过电子学处理并把信号送到一个与单色仪波长驱动机构同步转动的纸带式自动记录仪,这种仪器的示意图表示在图2-2上。

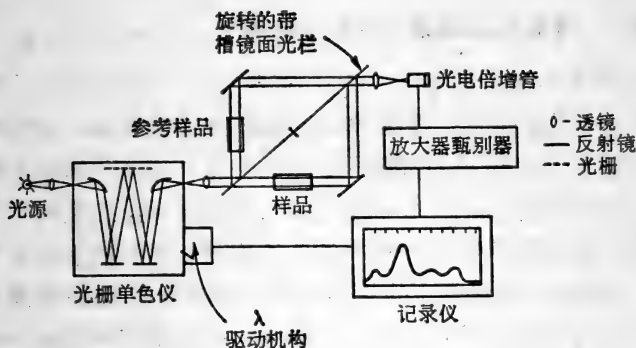


图2-2、双光束记录式分光光度计示意图,在2.3.2里对该仪器作了说明。

### 2.3.3 吸收光谱和分子的结构<sup>[1-4]</sup>

最早的有机化学家就已认识到纯有机化合物的颜色是一个重要的特征性质,一旦有了可靠的仪器,作为一种客观标准的吸收光谱就代替了颜色。当然,紫外区的吸收光谱可以表征许多无色的化合物,因此这种光谱的测量便成了化学家日常工作的一部分。一旦得到足够数量的光谱数据库,就可以找到一些经验规律而把有机化合物的分子结构与它们的吸收

光谱联系起来。人们很快就认识到：饱和化合物(例如环己烷)在可见和紫外区不吸收光,而含不饱和基团或这些基团的共轭组合的化合物总是吸收紫外辐射,有时也吸收可见光,这种不饱和分子的吸收中心叫做发色团,发色团由分子中所有共轭的多重键合的(不饱和的)原子构成,一般来说,发色团里共轭的不饱和中心的数目越多,化合物的光吸收就越趋向较长的波长。生色基是一些像—OH那样的基团,它在饱和分子中并不给与分子吸收可见光或紫外光的能力,但是当它与发色团结合时,可以使吸收光谱发生很大的改变。

### 2.3.4 吸收光谱和分子的电子状态<sup>[1,2]</sup>

量子力学告诉我们：对于原子核静止不动的分子,其电子的能量(动能加势能)只能取一些不连续的数值,这些数值对应于电子在原子核周围的一定的分布,这些分布中间的每一个对应于分子的一个电子状态。我们发现,在室温下与周围环境达到平衡的几乎所有的分子都处在最低能量的电子状态,即基态。能量较高的状态叫做电子激发态,基态和最低能量的激发态之间的能量差往往很大,以至不能用加热分子的办法使明显数量的分子达到激发态,这是因为在大量电子激发态出现之前,由于振动的加剧使化学键的分解或重组首先发生。

基态分子吸收一个光子后,分子便从它的电子基态跃升到某一个激发态,一个光子要被吸收(导致电子的激发),就必然在分子和光之间存在着一种相互作用,对于光生物学家感兴趣的分子,主要的相互作用是电子与光的电场之间的相互作用。只有能量相应于分子的较低和较高电子状态之间的能量差  $\Delta E$  的光才能被吸收,由于  $\Delta E$  与光的波长  $\lambda$  成反比[公式(2-2)],吸收光的波长越长,则  $\Delta E$  一定越小,因此,一个

含发色团的有机分子的基态和最低电子激发态间的能量差必定比饱和分子中相应的能量差小得多，用表示分子的电子状态的分子轨道模型很容易解释这种观察。

### 2.3.5 分子的电子状态、轨道和能级<sup>[6-9]</sup>

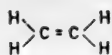
分子的每一个束缚的电子状态都由原子核之间一个特定的能量最低的几何位置或排列来表征，电子占据着原子核周围的一些特殊区域，这些区域叫做轨道。不同轨道上的电子具有不同的能量，每一个轨道可以被两个以下的电子所占据，而这两个电子必须具有相反的自旋(泡利不相容原理)。

分子内能量最低的电子(轨道)是内壳层电子，实际上就是原子的  $1s$  轨道，它们之所以能量最低，是因为它们平均来讲最靠近原子核。以乙烯为例，最低的轨道是碳的  $1s$  轨道。在含碳、氮或氧的分子中，两个原子的  $2s$  和  $2p$  电子相互作用而使分子中的原子结合在一起，这些成键的电子占据着与两个或更多的原子核有关的一些分子轨道，原子核之间的电子密度使核电荷受到屏蔽，因此它们与其它电子协调一致，平衡着原子核之间的排斥作用。

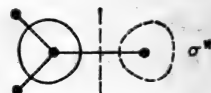
在乙烯里有两种类型的分子轨道，叫做  $\sigma$  轨道和  $\pi$  轨道，它们的区别在于对原子核之间轴线(或分子的平面)的对称性的不同。和原子的  $s$  和  $p$  轨道类似， $\sigma$  轨道相对于键轴具有圆柱对称性，而  $\pi$  轨道是反对称的，相当于绕键轴旋转  $180^\circ$  (见图 2-3)。 $\sigma$  轨道主要定域在两个原子核之间，它代表单键，乙烯中碳原子和氢原子之间的键是由  $\sigma$  轨道上的电子实现的，碳-碳键中的一个也是如此，另一个碳-碳键是  $\pi$  键。在具有共轭双键的分子中(例如丁二烯和苯)，有一些在几个原子核上(即与几个原子核联系在一起)运动的  $\pi$  轨道。

目前为止我们讲了处于乙烯的基态或最低电子状态的轨

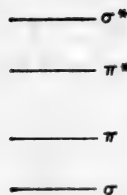
(a)



(b)



(c)



乙烯



甲醛

道(每一轨道由两个电子占据),在分子轨道模型中,与每一个成键的分子轨道对应,都有一个反键的分子轨道,因此,对于乙烯人们必须考虑两个反键轨道  $\pi^*$  和  $\sigma^*$ , 这里用星号表示反键特征。这些反键轨道都有一个与原子核间轴线垂直的节平面(图 2-3)。在这种轨道上,核间区域的电子密度低,根据其它电子的分布情况,这样低的电子密度可能不足以屏蔽原子核的电荷,因此可能得到一个净的排斥作用。

按轨道上电子能量由低到高的次序,乙烯的轨道可以写成  $2 \times (C)1s, 4 \times (C-H)\sigma, (C-C)\sigma, \pi, \pi^*, (C-C)\sigma^*, 4 \times (C-H)\sigma^*$ (图 2-4a)。为了产生基态或者能量最低的电子构型(分布),从能量最低的轨道开始,每个轨道上放两个电子(Aufbau 原理),乙烯有 16 个电子,它的基本构型是  $2 \times (C)1s^2, 4 \times (C-H)\sigma^2, (C-C)\sigma^2, \pi^2$ ; 也就是说,所有的成键轨道都填满了,而没有一个反键轨道上有电子(轨道上的充填数可以是 0, 1 或 2,它以轨道右上角的上标给出)。为了产生能量较高的电子构型或状态,一个或多个电子要从处于基态的轨道跃升到一个或几个空轨道上去,在一个电子的分子轨道模

---

图 2-3 (a) 乙烯的某些分子轨道的图示,其分子平面是该书页的平面,乙烯是一个平面分子(所有六个原子都在分子平面上)。碳-碳  $\sigma$  轨道有着对键轴的圆柱对称性,相应的  $\sigma^*$  轨道具有同样的对称性,但在两个原子间的中途有一个节点。图中未表示出对四个碳-氢键的  $\sigma$  和  $\sigma^*$  轨道。 $\pi$  轨道的节平面在分子的平面上;一部分(外周的实线)延伸到该平面的上方,符号相反的另一部分(内圈的虚线)伸到该平面的下方。 $\pi^*$  轨道在两个碳原子的中间有另一个节点;(b) 除了对乙烯必须考虑的轨道外,对甲醛还必须考虑氧的一个重要的原子轨道;(c) 位于(a)和(b)中所画乙烯和甲醛的每一个轨道上的电子的能量具有图上所示的关系,碳-氢  $\sigma$  和  $\sigma^*$  的能量(未画出)分别在所示能级的下方和上方。

型里,轨道的能量与分子的构型或轨道的充填情况无关,也就是说,电子-电子之间的某些相互作用可以忽略,因此,两个电子状态之间的能量差就是这两个状态上的轨道之间的能量差相加(要考虑到充填数是 1 还是 2),当然,人们只需要考虑这两个状态中充填情况不同的那些轨道。

在光吸收的过程中,较低的和较高的分子状态间的能差等于所吸收的光子的能量。当较低的状态是基态,而且分子只含低原子序数的元素时,使电子跳出内壳层轨道或  $\sigma$  轨道或者跃升到  $\sigma^*$  轨道所需的能量相当于比 220nm 更短的波长,这种能量一般地说超出了光生物学感兴趣的范围,因此,对大多数研究来说,这些轨道可以不管。如果把这个简化用于乙烯,需要考虑的轨道仅仅是  $\pi$  和  $\pi^*$  轨道。乙烯的基态构型是  $\pi^2$ , 需要考虑的唯一的电子的激发态是  $\pi^1\pi^{*1}$ , 由基态到激发态的变化(跃迁),可以只针对轨道改变的那个电子来写,即  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $\pi$  到  $\pi^*$ ), 激发态可以按这些轨道来命名,例如,在这种情况下激发态叫做  $\pi\pi^*$  态。

在价壳层中的非共价电子具有的能量可以和  $\pi$  轨道上的电子相比,在所感兴趣的波长范围内,光吸收的过程必须考虑这种电子。这种电子叫做非键合电子或  $n$  电子,它们所占据的轨道叫  $n$  轨道,这种电子的一个例子是甲醛中氧原子上的一对非键合电子,即  $2p$  电子。在甲醛里,碳和氧之间的键合和乙烯里一样涉及到  $\sigma$  和  $\pi$  轨道的电子(图 2-3), 甲醛的基态构型可以写成  $\pi^2n^2$ 。对甲醛必须考虑两个低的激发态,它们是由一个电子的跃迁  $n \rightarrow \pi^*$  和  $\pi \rightarrow \pi^*$  产生的,由于  $n$  轨道在能量上位于  $\pi$  轨道之上(图 2-4b), 所以  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁所需的能量比  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁小,就是说,激发态  $n\pi^*$  是能量最低的激发态。

当所有占据的轨道都含有两个电子时,根据泡利原理<sup>[10]</sup>,

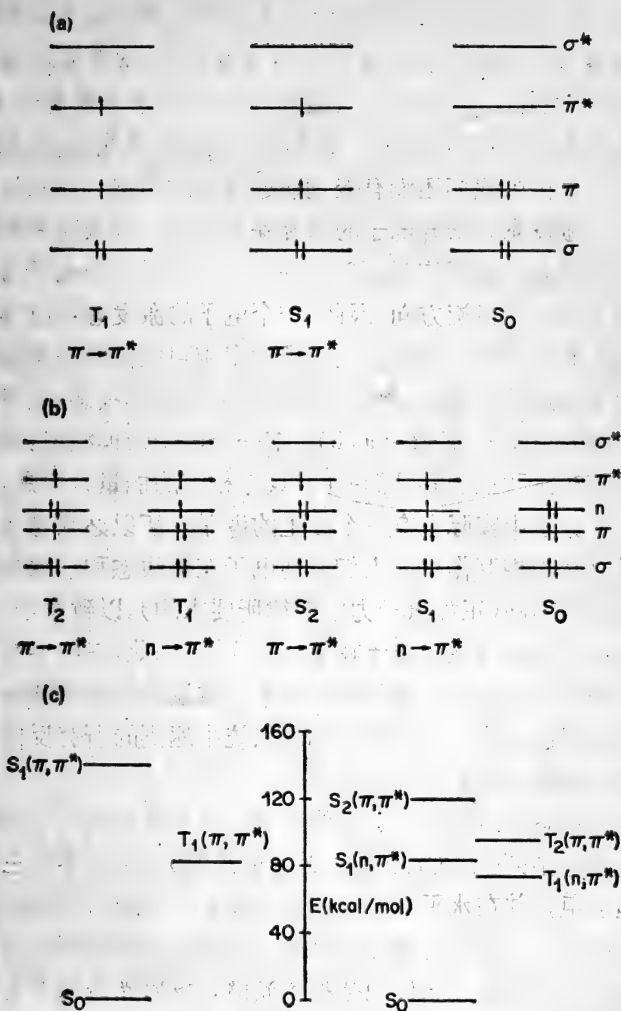


图2-4 (a)乙烯的基态( $S_0$ )、最低激发单线态( $S_1$ )和三线态( $T_1$ )构型的图示,原子的内壳层电子和碳—氢键里的电子没有描述;(b)甲醛的基态和低激发态的构型;(c)基态以上乙烯的低激发态(左)和甲醛的低激发态(右)的能量,这个图叫做态能图或 Jablonski 图,三线态从单线态水平位移是为了更清楚地表示相互转化的过程(参看图 2-8 b)。

自旋相反( $+1/2, -1/2$ )的电子数目相等,或者说电子的净自旋为零。状态的多重性由  $2S + 1$  给出,其中  $S$  是总的电子自旋。多重性等于 1( $S=0$ )的状态是单线态,而多重性等于 3( $S=1$ )的状态是三线态,乙烯和甲醛的基态都是单线态。直到现在为止的讨论中我们还没有谈到跃迁电子的自旋,如果从基态跃迁到激发态时跃升电子的自旋保持不变,则跃迁后的状态还是单线态。由于泡利原理允许电子在只有一个电子占据的轨道上有两种自旋方向,因此,一个电子的激发态可以得到数值为 1 的总自旋,例如,跃迁电子的自旋可以由它在基态时所持的方向逆转。因此,激发态的构型可以是单线态,也可以是三线态的自旋态(图 2-4 a, b)。在一个电子的模型里,相同构型的单线态和三线态是简并的(具有相等的能量),但是,由于每一个分子中实际上有一个以上的电子,所以必须考虑这些电子之间的相互作用,人们发现电子在单线态和三线态中的运动关系不同(正如量子力学定律所要求的),以致电子-电子的排斥能在三线态中低于在单线态中<sup>[10]</sup>,因此,三线态在能量上总是低于轨道构型相同的单线态,这说明能量最低的激发态是三线态,这一点对于在生物系统中遇到的所有反磁性的不含金属的化合物都是正确的。

在状态能级图上,水平线代表的状态按照它们之间的能量差垂直排列(基态放在能量为 0 的位置),单线态和三线态各成一组,并在水平方向上错开,图 2-4 c 给出乙烯和甲醛的一些低电子状态的状态能级图。各个状态的排列立足于各种光谱学的数据,它们包括吸收光谱、发射光谱和光电子能谱。可以看到:单线态的  $\pi, \pi^*$  态与三线态的  $\pi, \pi^*$  态之间的能量差(分裂)大于单线态  $n, \pi^*$  与三线态  $n, \pi^*$  之间的能量差,单线态—三线态的分裂可以变化很大,对很多分子来说,在最低激发单线态能级以下有不止一个三线态能级<sup>[11]</sup>,而



且，最低三线态的构型不一定要和最低单线态的构型对应，用光谱方法或某些间接方法观察往往确定不了分子的电子状态，也就是说不知道电子的构型及其伴随的性质，当情况如此时，这些状态就简单地按能量增高的顺序编号为  $S_1, S_2, \dots$  和  $T_1, T_2, \dots$ ，但是要知道  $S_1$  和  $T_1$  的构型可能是不对应的。

归纳起来，有机分子吸收光的波长范围在 200nm 以上，这是因为这些分子的基态上方存在着一些能量低于 140 kcal/mol 的电子状态，这些激发态是电子从  $n$  或  $\pi$  轨道跃迁到  $\pi^*$  轨道所产生的。在共轭系统中，能量最高的  $n$  或  $\pi$  轨道和能量最低的  $\pi^*$  轨道之间的能量间隔(激发能)随着共轭的程度而减小，因此，乙烯在 200nm 处吸收光，苯在 280nm，胡萝卜素在 450nm，而某些卟啉在 600nm 处吸收光，这些吸收(见下文)都是由于跃迁到激发单线态(净的电子自旋为 0)所引起的。对应于每一个激发单线态都有一个三线态，它们处于较低的能量，这就使得最低的电子激发态是一个三线态。既有理论的又有许多实验的方法来鉴别和定位(即比基态高多少能量)有机分子的一些低激发态。

在结束这节的讨论之前必须指出：处于电子激发状态的分子可能具有与基态分子很不相同的化学和物理性质，这就是为什么光化学反应一般给出的产物不同于只涉及基态分子的反应所给出的产物的原因之一。例如，我们不难理解为什么甲醛的  $S_{n,\pi^*}$  态的电荷分布和平衡态的几何构型不同于其基态的情形，一个  $n$  电子跃迁到  $\pi^*$  轨道会使碳和氧之间的结合变弱，因此与基态相比，激发态分子中的 C—O 键较长，并且伸张频率较低。至于电荷，与基态相比，激发态时的氧原子要正得多，而碳则较负，这是因为基态时电子只与氧原子结合，而在激发态里电子与碳和氧都发生了联系。

### 2.3.6 电子状态之间的光学跃迁和光吸收的规则<sup>[2,8,9,12,13]</sup>

分子从一个电子状态到另一个电子状态的光学跃迁包含着由于分子发射一个光子造成的能量损失或吸收一个光子而获得能量,为了满足能量守恒,分子由于跃迁所得到的或失去的能量等于光子的能量 $\Delta E = h\nu$ ,因此光学跃迁是一个共振过程。这个能量守恒定则可以换另一种方法来陈述: 对一个特定能量的光子(一种特定波长的光),只有当分子系统存在着一个能量高度正好等于该光子能量的激发态时,它才能被该系统吸收。为了有效地吸收光,这种能量的匹配是一个必要条件,但它不是一个充分条件。

假如共振条件满足,光吸收的几率可以看成振子强度 $f$ ,光吸收几率(吸收强度)的实验测量与摩尔消光系数 $\epsilon$  [公式(2-6)]有关。由于多原子分子的光谱较宽,即吸收分布在一个波长范围内(图2-1),因此振子强度的度量便是吸收带的积分强度:

$$f \sim \int_{\bar{\nu}_1}^{\bar{\nu}_2} \epsilon d\bar{\nu} \quad (2-8)$$

式中 $\bar{\nu}_1$ 和 $\bar{\nu}_2$ 是吸收带两端的波数( $\bar{\nu} = 1/\lambda$ )。

振子强度可以和分子跃迁前后所处的两个电子状态上的电子分布联系起来,即振子强度与一个叫做跃迁矩的量的平方成正比:

$$f \sim |\mathbf{M}|^2 \quad (2-9)$$

对于生物学家感兴趣的分子,这个跃迁矩由下式给出<sup>1)</sup>:

$$\mathbf{M} = \langle \phi_f | e\mathbf{r} | \phi_i \rangle \quad (2-10)$$

式中 $\phi_f$ 和 $\phi_i$ 分别为终态和始态的电子波函数(即跃迁是 $\phi_i \rightarrow \phi_f$ ), $e$ 是电子电荷,而 $\mathbf{r}$ 是位置矢量(在笛卡尔坐标系中 $\mathbf{r} = \mathbf{X} + \mathbf{Y} + \mathbf{Z}$ )。跃迁矩是电子跃迁造成的电子电荷在分

1)  $\langle \rangle$ 是一个数学符号,表示对某一适当空间的积分。

子中直线位移的一种度量,造成光子吸收的相互作用本质上是光的电场与分子中电子之间的相互作用,这种相互作用和吸收一个光子的几率随跃迁矩而增大。

在一个电子的近似中,波函数  $\phi_i$  和  $\phi_j$  描写分子中的电子,它们用跃迁电子所占据的终了和起始的“一个电子”的轨道(波函数)来代替,例如,如果忽略电子的自旋,参照上一段,甲醛中  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁的跃迁矩由下式给出:

$$M_{n,\pi^*} = e \langle \pi^* | \mathbf{r} | n \rangle \quad (2-11)$$

选择定则可以进一步简化  $M$  的估值,它可以从数学上告诉我们一个电子的跃迁矩是否为 0,例如,如果始态和终态的多重性不同,即一个是单线态而另一个是三线态的话,则自旋选择定则要求跃迁矩为 0,多重性的改变可以和跃升电子自旋状态的改变联系在一起,总的波函数是空间波函数与自旋波函数的乘积,例如,我们可以把  $n$  个电子的总波函数表示为  $n\alpha$ ,其中  $\alpha$  是两个自旋态之一。让我们考虑处在  $\pi^*$  轨道上的一个具有相反自旋态  $\beta$  的电子,即  $\pi^*\beta$  电子,对  $n\alpha \rightarrow \pi^*\beta$  跃迁,  $M$  由  $e \langle \pi^*\beta | \mathbf{r} | n\alpha \rangle$  给出,这个表达式与  $e \langle \pi^* | \mathbf{r} | n \rangle \langle \beta | \alpha \rangle$  等价,由于  $\langle \beta | \alpha \rangle = 0$ ,所以  $M = 0$ 。当  $M = 0$  时,就说该跃迁是禁戒的,这种情况的辐射性跃迁(涉及一个光子)叫做自旋禁戒的。这种叫法的物理学道理可以说明如下:光的电场和电子之间的相互作用不能改变该电子的自旋,也就是说,由于吸收一个光子,分子中的这个电子从一个自旋态变到另一个自旋态是被禁止的。

因为跃迁矩表达式中的各项由于波函数的对称性而互相消掉,于是对称性选择定则将告诉我们跃迁矩是否为 0,一个跃迁可以是在自旋上允许的而在对称性上禁戒的。有一些数

1) 积分  $\langle \alpha | \alpha \rangle$  和  $\langle \beta | \beta \rangle = 1$ , 而  $\langle \alpha | \beta \rangle$  和  $\langle \beta | \alpha \rangle = 0$ 。

学上的方法,例如群论,可以用来考虑对称性<sup>[2,6-9,12,13]</sup>。

即使不是自旋或对称性禁戒的,但是由于终态和始态的单电子波函数在空间上重叠少而使跃迁矩的数值较小,跃迁的几率也可能低,即吸收可能弱。 $n\pi^*$  跃迁就是这种情况,而这也是  $n\pi^*$  吸收波段消光系数低( $\epsilon = 10-100$ )的原因之一。

实际上,跃迁矩的量值无论如何不会为零,即使这种跃迁受到上面讲到的那些一级选择定则的禁止。这是因为所用的近似(“一个电子”)波函数没有包含电子-电子的相互作用,也没有包含电子与原子核相互作用的某些特征。一级选择定则又是建立在玻恩-奥本海默(Born-Oppenheimer)近似的基础上的,这个近似认为电子和核的运动是独立无关的,事实上,原子核的运动(分子的振动)能够大大影响跃迁矩的大小。

由于自旋态不“纯”,即单线态具有三线态的某些特征,而三线态具有单线态的某些特征,因此形式上是自旋禁戒的跃迁也有一定的强度。这种单线态和三线态的“混合”是自旋-轨道耦合的结果,自旋-轨道耦合是与电子自旋相联系的磁矩和电子轨道运动产生的磁矩之间的相互作用。可以把忽略了这一相互作用的近似波函数混合相加来构成考虑到自旋-轨道耦合的波函数。让我们看一下混有少量激发单线态  $S_x$  的分子的最低三线态  $T_1$ ,这种三线态可以写成  $(T_1 + \delta S_x)$ ,式中  $S_x$  是混入的激发单线态,而  $\delta$  是混合系数。从基态  $S_0$  到这种三线态的跃迁的跃迁矩由下式给出:

$$\mathbf{M}_{S_0 \rightarrow T_1} = e \langle (T_1 + \delta S_x) | \mathbf{r} | S_0 \rangle \quad (2-12)$$

$$= e \langle T_1 | \mathbf{r} | S_0 \rangle + \delta e \langle S_x | \mathbf{r} | S_0 \rangle \quad (2-13)$$

由于自旋选择定则,第一项为0,所以:

$$\mathbf{M}_{S_0 \rightarrow T_1} = 0 + \delta \mathbf{M}_{S_0 \rightarrow S_x} \quad (2-14)$$

这就是说,从  $S_0 \rightarrow S_x$  跃迁导出  $S_0 \rightarrow T_1$  跃迁的强度,  $S_0 \rightarrow T_1$  跃迁的强度取决于反映自旋-轨道耦合的混合系数  $\delta$  和“借来

的”跃迁强度  $M_{s_0 \rightarrow s_x}$ 。对于含低原子序数元素的化合物，自旋-轨道耦合较弱，但是当参入重原子(例如溴)时，它大大增强。一些对称性选择定则将有助于我们发现什么样的单线态和三线态可以通过自旋-轨道耦合而混合。

形式上是对称性禁戒的跃迁也不那么断然禁戒，这是因为电子的运动实际上不是与原子核的运动无关。和上面对单线态-三线态混合所用的形式类似，各种电子状态都不是纯粹对称的，由于分子的振动，可以设想存在着不同对称性状态的混合；这些状态的混合是由所谓的振动耦合造成的。对称性禁戒跃迁从对称性允许跃迁“借来”强度，有一些选择定则将告诉我们什么样的状态可以通过振动耦合而混合。

### 2.3.7 振动能级和吸收带宽<sup>[1,2,11-13]</sup>

对分子的每一个电子状态都存在一组振动方式(对非直线的多原子分子，振动方式数是  $3n-6$ ，其中  $n$  是分子中原子的数目)，这些方式的每一个都和按振动频率排列的能级相联系，这些能级的间隔比电子能级间的间隔小，在图 2-5 上，迭加在画成粗线的电子能级上的就是代表振动态的能级(只画出一种振动方式)。分子的总能量是电子能量、振动能量、转动能量(与分子的转动有关)和平动能量(与分子的直线运动有关)的总和，后两种能量在这里可以忽略，即，总能量取作电子能量加上振动能量。

在生理温度下，大多数与周围环境达到平衡的分子都处于电子基态的最低( $v=0$ )振动能级，用适当波长的光，光吸收过程能使分子跃升到某一种电子态和振动能级的组合，如果可以跃迁到较高电子状态的若干振动能级，则吸收光谱变宽(能量分散)。是否观察得到每个电子加振动的跃迁？这主要取决于能够激发的振动方式的数目和振动能级之间的间

隔。大多数情况下，溶液中生物分子的吸收光谱由一些宽的谱带组成，而没有很多“结构”，这些无结构的谱带都是许多重叠的振动跃迁的包线(图 2-5)。

纯粹的电子跃迁是从基态的  $\nu = 0$  的能级到激发态的  $\nu = 0$  的能级的跃迁，这个  $0 \rightarrow 0$  带；正如所称呼的，是对于这种跃迁的吸收谱中波长最长的（能量最低的）振动谱带。因此，吸收光谱学所观察的基态和各个激发态之间电子的能量差是根据各吸收谱带的红边或起点得到的。

电子跃迁的振子强度（几率）分配给各个振动谱带[公式

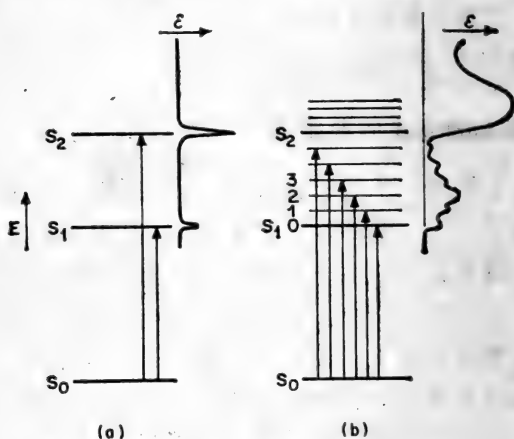


图 2-5 (a) 类似原子的电子能级，这种光学跃迁在带宽上很窄，即只有波长对应于电子能差的光才能被吸收。这种吸收谱是“线”谱，由于光谱仪的限制，吸收带有一个如图所示的宽度；(b) 像分子的能级图，叠加在电子能级(粗线)上的都是表示振动状态(画出的只是一种振动方式)的能级(细线)。除了纯粹的电子跃迁 ( $0 \rightarrow 0'$  带)外，基态分子可以吸收这样的光：它对应于分子跃迁到振动状态也是激发的电子激发态，即对应于  $0 \rightarrow 1'$ 、 $0 \rightarrow 2'$  ……等的跃迁。可以看到各个振动跃迁(对  $S_0 \rightarrow S_1$  的谱)，或者，在振动能级间隔很近的情况下，看到的只是这些振动跃迁的包线(对  $S_0 \rightarrow S_1$  的谱)。

(2-8)1, 每一个振动谱带的相对强度与几个因素有关, 其中包括分子在激发态的平衡几何构型和在基态的平衡几何构型之间的差别。Franck-Condon 原理宣称: 电子的重新分布(轨道的改变)比原子核的运动快得多, 因此, 吸收光子的前夕和刚吸收过后, 分子的几何形状未变; 光的吸收是一个“垂直的”过程。以双原子分子为例(图 2-6), 如果这两个状态(它们之间的跃迁是允许的)在平衡的几何构形上没有任何差别或差别很小, 则 0—0 谱带将是强带, 但是倘若它们的平衡几何构型差别很大, 则某些能量较高的振动跃迁将比较强。各个振动跃迁的相对几率叫做 Franck-Condon 因子。

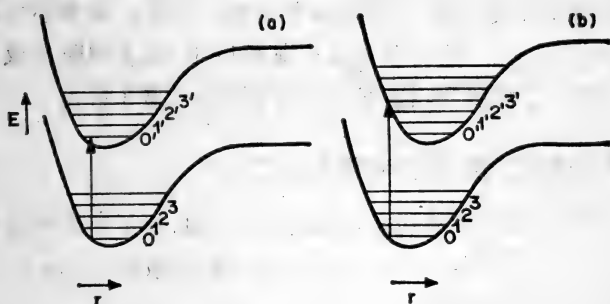


图 2-6 对基态和电子激发态两种情况, 双原子分子的位能作为原子间距离  $r$  的函数。在(a)中, 两种电子状态下最低能量的原子间距离(平衡键距)是相同的; 在(b)中, 激发态有更大的平衡键距, 正如图中所示, 最可几振动跃迁是 0-3' 谱带。

## 2.4 电子激发态分子的弛豫路径和速率<sup>[13-19]</sup>

考虑一个处于电子激发态  $S_x$  或  $T_x$  上某个较高振动能级的分子, 它的能量处在可见光或紫外光区域, 且该激发的分子是在一个不太高的温度下达到热平衡的某一凝聚相系统的一部分, 例如, 该激发分子是某一生物系统的一部分。一般来

说,这个分子将发生振动弛豫,即把振动能量损失给它周围的环境,而在很短的时间里( $10^{-13}$ — $10^{-12}$  s) 到达  $S_x$  或  $T_x$  的  $v=0$  的振动能级。因为这个分子还要进一步弛豫,它必然要损失电子的能量,这就是电子的弛豫。和吸收相反,电子弛豫可以通过辐射的方式进行,这时,分子发射一个光子并降到一个较低电子状态。下面将会看到,当我们考虑生物系统中的分子时,辐射性电子弛豫只对  $S_1$  才是重要的,某些情况下对  $T_1$  也是重要的。另一方面,电子弛豫也可以通过非辐射的方式进行,这时,电子的能量转换为分子内的振动能,然后再发生振动弛豫。无论是电子弛豫还是振动弛豫,最终都使分子回到基态,这两种过程都叫做光物理过程。弛豫还可以通过化学过程进行,这时分子发生某种反应,发生键断裂或者形成新的键,这种过程叫做光化学过程(参阅第 3 章)。

## 2.4.1 辐射弛豫,荧光和磷光<sup>[13-18]</sup>

处于最低激发单线态或最低三线态的分子自发地发射一个光子而返回基态,  $S_1 \rightarrow S_0$  的发射过程叫做荧光,而  $T_1 \rightarrow S_0$  的发射过程叫做磷光。

支配发射几率的选择定则和支配吸收几率的选择定则相同,这是因为这两个过程正好彼此互逆。跃迁几率越高,则发射速率越快,激发态的寿命越短。如果激发的分子只通过发射光子而弛豫,则激发态的寿命就完全由发射速率( $k_{\text{发射}}$ )来决定,而发射速率正比于振子的强度:

$$k_{\text{发射}} = 1/\tau^0 \propto f \quad (2-15)$$

式中  $\tau^0$  叫做辐射寿命,振子强度  $f$  和  $\tau^0$  可以由吸收谱上波长最长的跃迁计算出来。 $S_1$  态的辐射寿命范围很宽,从完全允许跃迁时的  $10^{-9}$  s, 到对于非常弱的  $S_1 \rightarrow S_0$  跃迁情况的  $10^{-5}$  s。自旋禁戒性使  $T_1$  有较长的辐射寿命,范围从  $10^{-3}$  —  $10^2$  s。



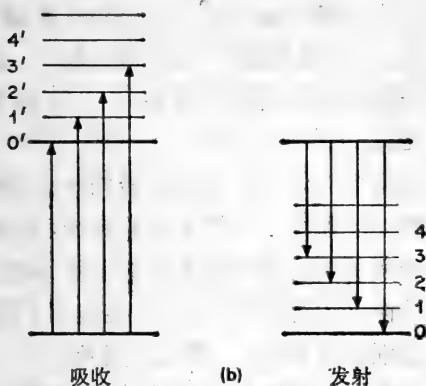
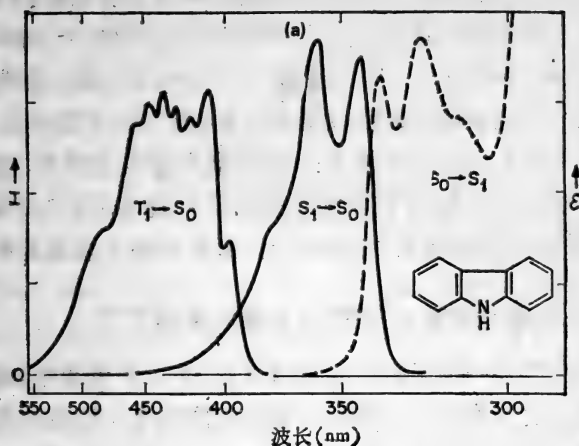


图2-7 (a) 溶在乙醇中的吡啶的吸收谱和发射谱。各个谱的强度不是按比例的，这些谱画在以波长为单位表示的能量坐标上，这种表示法最能说明  $S_0 \rightarrow S_1$  吸收谱和荧光 ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) 谱之间的镜像关系。请注意磷光光谱的位置在荧光光谱的红区方向(较低的能量)，由于  $S_0 \rightarrow T_1$  的吸收太弱，所以用普通的吸收光谱学方法观察不到，估计它应该从 400nm 附近开始；(b) 当吸收跃迁和荧光跃迁都以弛豫的振动态为起点时，图显示了它们之间的光谱关系。

由于振动弛豫比光发射过程快,所以发射总是始于激发态的  $\nu = 0$  的振动能级,它可以跃迁到基态的各个振动能级,因此  $0-0'$  带是发射谱中能量最高的(波长最短的)谱带。对应于同一个电子跃迁的吸收谱和发射谱在  $0-0'$  谱带处重迭,但是各自沿相反的方向展开:吸收谱向短波长展开,发射谱向长波长延伸。吸收谱和发射谱常互为镜像(图 2-7),根据发射谱的蓝边(能量最高的)可得到激发态高出基态的能量。

#### 2.4.2 无辐射弛豫,内转换和系统间渡越<sup>[17-19]</sup>

内转换是一种无辐射的弛豫过程,在这种过程中,处在某一电子激发态的分子转变到多重性相同但电子能量较低的一个状态 ( $S_x \rightsquigarrow S_y, T_x \rightsquigarrow T_y$ , 其中  $x > y$ ),而在这一过程中损失的电子能量先转换为振动能。系统间渡越 (*intersystem crossing*) 是一个类似的弛豫过程,在这种过程中,处在某一电子激发态的分子转变到多重性不同的一个状态去,例如  $S \rightsquigarrow T_1, T_1 \rightsquigarrow S_0$ 。

除了少数的几个例外,即使分子最初被激发到较高的激发单线态,观察到的仍然只是来自  $S_1$  的荧光,也就是说,荧光光谱与激发分子所用光的波长无关,这证明了在电子激发态之间存在着内转换。还可以指出,由于某些分子的  $S_1$  到  $S_0$  的内转换比荧光过程快得多,它们便没有荧光。

很多分子在激发到激发单线态以后呈现磷光,这一现象证实了系统间渡越的发生。还可以指出,由于某些分子从  $T_1$  到  $S_0$  的系统间渡越比磷光过程快得多,所以它们激发到  $T_1$  以后并不发磷光。

在内转换和系统间渡越两种过程中,转化的电子能量起初是以分子内的振动能出现的,这就是说,这种过程发生的紧前和紧后,分子的总能量实质上是相同的。非辐射弛豫的速

率取决于使始态和终态耦联的电子相互作用和振动相互作用,并取决于它们的电子能量之差。一般来讲,要转换的电子能量越大,过程就越慢,即始态和终态在电子能量上越接近,则发生非辐射弛豫的可能性越大,弛豫得越快。对大多数光生物学关心的分子,激发态之间的电子能差比  $S_1$  和  $S_0$  之间或  $T_1$  和  $S_0$  之间的能量间隔小得多,因此,从较高的激发态到  $S_1$  或  $T_1$  的非辐射弛豫往往比从  $S_1$  或  $T_1$  到  $S_0$  的跃迁快得多。一般而言,激发态之间的内转换比始于这些状态的辐射跃迁或光化学过程快,然而情况往往是这样,从  $S_1$  或  $T_1$  到  $S_0$  的非辐射弛豫在速度上却和从  $S_1$  或  $T_1$  到  $S_0$  的辐射过程(荧光或磷光)及光化学过程不相上下。对非辐射过程的自旋限制类似于对辐射过程的自旋限制,因此,对于同样的电子能量差,系统间的渡越往往比内转换要慢。

总结起来,发色团吸收光而激发到  $S_x(x > 1)$  态以后,一般应该发生的通过单分子路径的弛豫如下(参考图 2-8): 快速的内转换和振动弛豫过程使分子很快到达振动平衡态  $S_1(v=0)$ , 除光化学过程外,  $S_1$  态的弛豫路径有三个分支——荧光( $S_1 \rightarrow S_0$ )、内转换( $S_1 \rightsquigarrow S_0$ )和系统间渡越( $S_1 \rightsquigarrow T_x$ )。经过其中一个路径弛豫的分子的相对数目与这三个竞争过程的相对速率有关,而一般来说与初始激发的是哪个单线态无关。从  $S_1$  开始的系统间渡越是产生分子三线态的主要途径,  $S_1$  态中发生系统间渡越的分额(三线态的产额)变化很大,但是有很多分子,如苯乙酮那样的芳香酮,由于多种原因,它们的荧光过程较慢( $S_1$  是  $n, \pi^*$  态),而系统间渡越相对来说较快,因此几乎所有的分子都从  $S_1$  渡越到三线态。可以直接从  $S_1$  到  $T_1$  发生系统间渡越,或者可以从  $S_1$  渡越到某一较高的三线态,然后通过快速的内转换到达  $T_1$ 。把光化学过程除外,  $T_1$  状态的弛豫路径有两个分支: 磷光( $T_1 \rightarrow S_0$ )和系统间

的渡越( $T_1 \leadsto S_0$ ),由于自旋的限制使  $T_1$  到  $S_0$  的系统间渡越较慢,因此在许多情况下,禁戒的辐射过程——磷光可以与它

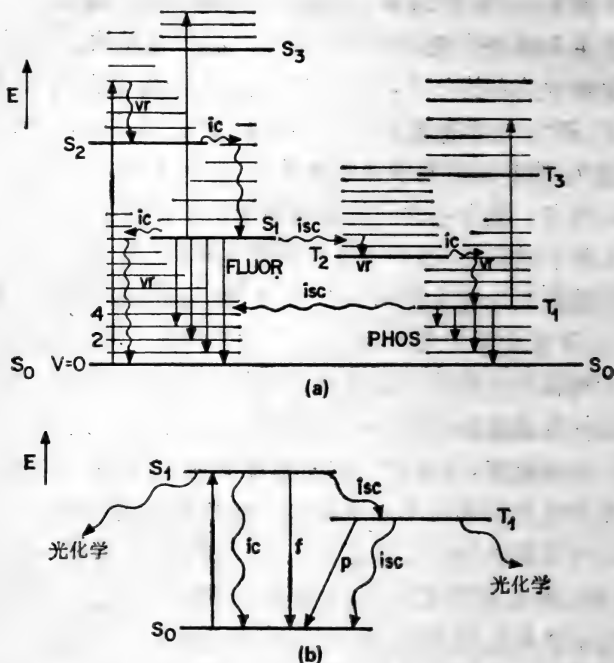


图 2-8 (a)有机分子的一般弛豫图(参阅 2.4.2),电子能级和振动能级分别用粗、细水平线表示,对每一个电子状态只画出了一种振动模式。辐射跃迁以直箭头表示,非辐射弛豫过程用波浪形箭头表示: vr, 振动弛豫; ic, 内转换; isc, 系统间渡越; FLUOR, 荧光; PHOS, 磷光。在这个图上,分子吸收一个光子而激发到  $S_1$ , 经快速的内转换和振动弛豫后,分子变到  $S_1$  态,从  $S_1$  态,或者非辐射地变到  $S_0$ , 或者发荧光, 或者发生系统间的渡越(在这个例子中是渡越到  $T_1$ )。激发分子也可以吸收光子而跃升到更高的能级,图中表示了两种这样的吸收:  $S_1 \rightarrow S_3$  和  $T_1 \rightarrow T_3$ , 这两个跃迁都是自旋允许的,因此可能是强线,它们提供了测定  $S_1$  和  $T_1$  状态的方法(参阅 2.6); (b) 对大多数研究工作来说,关系到激发态过程的动力学和量子产额时, 需要考虑的只是这个简化的弛豫图上表示的那些过程。各个弛豫过程都作了标记,以便和 2.4.3 里考虑的速率常数对应起来,于是, f, p, ic 和 isc 分别指荧光、磷光、内转换和系统间渡越。

竞争。当可以把猝灭三线态分子(例如被分子氧猝灭)的双分子反应排除时,很多分子都表现出磷光。在刚性很好的系统中可以忽略双分子过程,所以当液体样品在很低的温度下冰冻时,往往观察到磷光。

### 2.4.3 量子产额、寿命和弛豫过程的速率

分子的某一光物理或光化学事件的量子产额  $\Phi$  定义为:

$$\Phi = \frac{\text{所研究的分子事件数目}}{\text{吸收的光子数}} \quad (2-16)$$

假定这些光子只是被所研究的分子所吸收,并且被激发到  $S_1$  态,于是荧光的量子产额  $\phi_f$  是:

$$\phi_f = \frac{\text{以荧光发射的光子数}}{\text{吸收的光子数}} \quad (2-17)$$

根据上面所作的假定,荧光的量子产额相当于激发到  $S_1$  的分子中发射荧光的分数,这个发荧光的分数由  $k_f(k_f + {}^1k_{ic} + {}^1k_{isc})^{-1}$  给出,式中  $k_f$  是荧光的速率,  ${}^1k_{ic}$  是始于  $S_1$  的内转换速率,  ${}^1k_{isc}$  是系统间渡越的速率。这就是说,  $S_1$  态分子中发荧光的分数由荧光速率除以  $S_1$  态经所有路径(在这些例子中,光化学过程除外)弛豫的速率得到。  $S_1$  态的寿命  ${}^1\tau$  是它衰变速率的倒数,即  $(k_f + {}^1k_{ic} + {}^1k_{isc})^{-1}$ , 辐射寿命  ${}^1\tau^0$  是  $k_f^{-1}$ , 即  $S_1$  如果只通过荧光而衰变时它的寿命,因此,  $\phi_f = {}^1\tau/{}^1\tau^0$ 。

测量荧光强度和被所研究的分子吸收的光的强度,便可以以实验测定  $\phi_f$ 。用非常短的光脉冲激发系统后,通过测量  $S_1$  态分子的浓度与时间的关系可以实验确定  ${}^1\tau$ , 荧光强度是  $S_1$  的浓度的一种度量,于是,  ${}^1\tau$  就是测得的荧光寿命。  $k_f$  或  ${}^1\tau^0$  的估值可以由吸收谱得到。

磷光的量子产额  $\phi_p$  是:

$$\phi_p = \frac{\text{以磷光发射的光子数}}{\text{吸收的光子数}} \quad (2-18)$$

$\phi_p$  也可由  $S_1$  态分子中渡越到三线态的分数与  $T_1$  分子中发磷光的分数的乘积给出,即:

$$\phi_p = [{}^1k_{isc}(k_f + {}^1k_{isc} + {}^1k_{ic})^{-1}][k_p(k_p + {}^3k_{isc})^{-1}] \quad (2-19)$$

式中  $k_p$  是磷光的速率,  ${}^3k_{isc}$  是从  $T_1$  到  $S_0$  的系统间渡越的速率。由于  ${}^1k_{isc}$  和  $k_p$  都是可以忽略的,所以  $\phi_p$  可能很小,磷光的产额并不一定反映三线态的产额。

如果排除光化学过程和双分子猝灭过程,  $T_1$  的寿命  ${}^3\tau$  是  $(k_p + {}^3k_{isc})^{-1}$ , 有几种实验方法测量三线态的浓度<sup>[11]</sup>。因此有可能求出所有弛豫过程的速率常数, 这些常数决定了电子激发态分子弛豫的路径。

## 2.5 激发态分子的相互作用<sup>[16,20]</sup>

### 2.5.1 微环境的影响

由于处在电子激发态的分子的电子分布和几何特征往往很不同于基态的分子, 因此激发的分子与周围分子(溶剂等)的相互作用也往往有别于基态分子的相互作用, 当分子的微环境改变时, 这些差别就会引起光谱特性、弛豫路径、速率和产额的变化, 用微环境影响分子光谱特性的办法可以得到有关分子和微环境的信息。

各种溶质-溶剂的相互作用可能改变光谱(能量)和发光产额, 这时必须考虑溶剂化的静态和动态性质。由于激发分子的产生和弛豫之间有一个延迟, 因此溶剂能够重组分子的周围环境。溶剂对发射光谱的影响也许不同于对吸收光谱的影响, 溶剂对分子光谱特性的影响是一个大而复杂的题目, 不能在这里详谈, 这里只想说明一点: 很多分子的吸收或荧光光谱有明显的位移(波长改变), 或者它们的荧光产额有很大

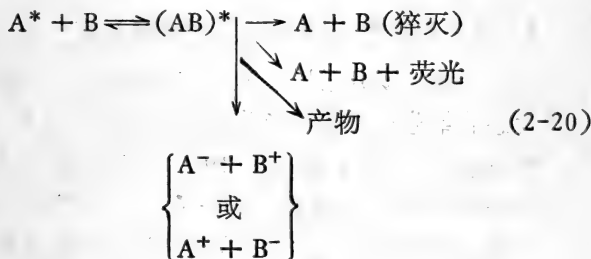
的改变,荧光产额的改变与溶剂的某一种或多种特性有关,诸如极性、极化率、结合氢的能力、pH或粘度等。这种发荧光的分子可能是微环境的强有力的“探针”,特别是因为荧光能以非常高的灵敏度加以测量。

## 2.5.2 激发态分子的双分子反应

激发态分子可以与其它基态分子进行许多种反应,这些反应类型中的大多数将在第3章里作为光化学原初过程去讨论。许多激发态分子的双分子反应直接导致激发分子的猝灭(退激),或者形成叫做激发复合物(exciplex)的瞬态的激发的双分子复合物。

激发态分子的双分子猝灭反应的一大类是电子能量的传递,在这种过程中,电子的能量从原来的激发分子传给一个受体分子,这种重要的反应类型将在2.7里专门讨论。

说明激发复合物形成和反应的一个简单图式是:



当A和B这两个分子都在基态时,它们不形成复合物,当一个(A)被激发时就有复合物形成,这个激发复合物只在激发态下才是稳定的,它可以是可逆的,即激发复合物可以向基态弛豫,分解给出原来的两个未激发的起始分子。其它的一些衰变途径可能导致化学上的变化。电子从复合物中的一方传递到另一方是激发复合物的一种特别有趣的反应,这种电子传

递有时两个方向都可以。许多激发复合体发荧光，其发射光谱都比未复合的激发分子的荧光波长长，它们向长波长方向特征性偏移。

在一个激发的分子和一个相同的基态分子之间也可以形成复合体：

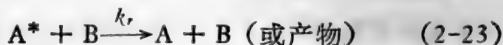


对这个激发态二聚体起了一个名称，叫做激发子(excimer)，它是特殊的一类激发复合体，电子的激发能被它的两个分子所平分。

激发复合体中把两个分子束缚在一起的相互作用在基态下是完全不存在的，这些相互作用主要包括：①激发-共振作用；激发能被两个分子共同分享，从而使总的能量降低了( $A^*B \longleftrightarrow AB^*$ )；②电荷传递作用( $A^+B^- \longleftrightarrow A^-B^+ \longleftrightarrow AB^*$ )。一个处于激发态的分子比起它在基态来说，既是一个更好的电子供体，又是一个更好的电子受体。

### 2.5.3 双分子动力学, Stern-Volmer 猝灭

测定激发态双分子反应速率常数的一种方便的方法是测量激发态的单分子衰变和双分子猝灭之间的竞争，这个方法的总的思想 Stern 和 Volmer 在 1919 年系统地陈述过。让我们考虑一个例子：一个激发的分子  $A^*$ ，它以速率常数  $k_d$  经单分子衰变到达它的基态，同时它又以特定的速率常数  $k_r$  与一个基态分子 B 反应，即：



第一个过程（它包括所有的单分子的退激途径）的速率由  $k_d \cdot [A^*]$  给出，而第二个过程的速率由  $k_r [A^*][B]$  给出，如果  $A^*$  的衰变是可以用某种方法即通过它发光的衰变速率直接测量



的话,那就可以研究 B 的加入对含有  $A^*$  的系统的影晌。当加入的 B 多,  $A^*$  就猝灭得多,由于这种猝灭的结果,  $A^*$  的衰变速率就增加, B 存在时  $A^*$  的衰变速率等于  $k_d[A^*] + k_r[A^*][B]$ 。由于激发态的浓度难以测量,人们希望不直接测量  $[A^*]$  而能求出  $k_r$ , 为此可以测量  $A^*$  被 B 猝灭的效率与  $[B]$  的函数关系。

令不存在 B 时  $A^*$  的反应量子效率等于  $\Phi^0$ , 而存在 B 时这同一反应的量子效率是  $\Phi$ , 根据量子效率的定义,我们可以用速率常数给出如下关系式:

$$\Phi^0/\Phi = 1 + k_r[B]/k_d \quad (\text{Stern-Volmer 关系}) \quad (2-24)$$

如果  $\Phi^0/\Phi$  对 B 作图得到一条直线, 则 Stern-Volmer 关系成立, 这条直线的斜率等于  $k_r/k_d$ 。因为  $k_d$  可以由  $A^*$  的衰变直接测量, 因此就可以算出  $k_r$ , 当然, 如果可以独立地估计出  $k_r$ , 那么也可以用这种方法得到  $k_d$  的估值, 因此, 利用 Stern-Volmer 关系可以测出双分子光化学反应的速率常数。

## 2.6 激发态分子的探测

可以通过它们的光发射(对  $S_1$  和  $T_1$  态)、光吸收或者通过它们与另一种分子的相互作用产生的可测事件来探测激发态分子, 已有大量文献谈到各种实验技术和仪器方法, 许多仪器在市场上可以买到, 这里只讨论一些原理。

### 2.6.1 发光光谱学<sup>[13-16]</sup>

发光光谱仪记录通常用单色光激发的样品的发射光谱, 样品的发射光通常以与激发光束成  $90^\circ$  角的方向聚焦到一个

\*原文中 (2-24) 式为  $\Phi^0/\Phi = 1 + k_r[A]/k_d$ , 是错的, 式中的  $[A]$  应改为  $[B]$ 。——译者

单色仪的狭缝上,在单色仪的出射狭缝处放一个光电倍增管探测器(图 2-9),单色仪进行波长扫描,发射光谱显示在一个  $x-y$  记录仪上。如果发射光单色仪置于发射谱的某一波长上,激发光单色仪可以按波长扫描,这时记录到激发光谱。在最简单的情况下,激发光谱就是作用光谱(参阅 1.5.4 和 3.7),它和该发光生色团的吸收光谱完全相同。

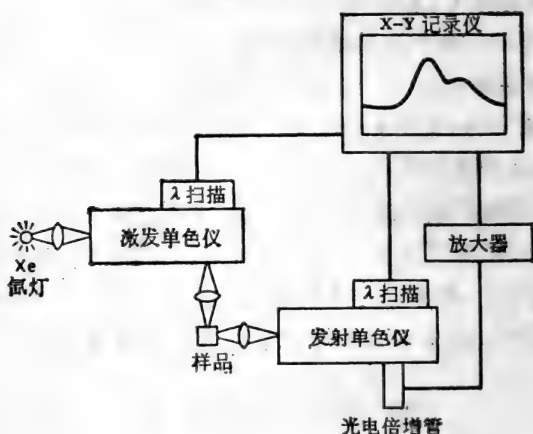


图 2-9 在 2.6.1 里叙述的发光光谱仪的示意图。

发光寿命可以用多种方法获得,人们可以用宽度比待测寿命短得多的光脉冲激发样品,并用响应足够快的探测器观察发光的衰减。许多光电倍增管具有毫微秒的响应时间,而脉冲激光器可以用来作为毫微秒强光脉冲的光源,从而不难测出大多数的荧光寿命。

## 2.6.2 闪光光解<sup>[22,23]</sup>

激发的分子可以吸收光而被激发到更高的能态(图 2-8 a),由于激发能越高,两个电子状态之间的间隔就越小,所以大多数激发态分子比相应的基态分子吸收波长更长的光。许

多短寿命的中间产物,如激发复合体和离子等,也有特征的吸收光谱。为了得到足够高浓度的激发态分子或中间产物以便能够通过它们的光吸收观察它们,必须使用极强的光脉冲(闪光),如果要测定所研究产物的寿命,这个光脉冲的宽度必须短于所研究产物的寿命,这种技术叫做闪光光解,图 2-10 上画出了一个简单的实验图,对于寿命为微秒或更长的产物,可以用气体闪光灯,对于更短时间的测量则必须使用脉冲激光器。宽度微微秒的强激光脉冲的出现,使我们有可能直接测量像振动弛豫和激发态之间的内转换这样快的过程。

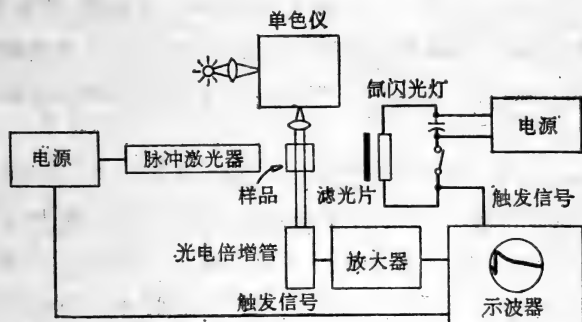


图 2-10 动力学闪光光解装置的图示。用氙气闪光灯发出并经过过滤的光或脉冲激光器的光激发样品,记录所监测单色光束的吸收与时间的关系,这里用示波器作记录装置,它的触发与光解闪光同步。如果把光电倍增管换成摄谱仪,而样品用波长连续的光监测,则一次实验即可得到瞬态产物的整个吸收光谱。最现代化的仪器应用了电子条纹照相机,它可以用亚毫微秒的分辨率记录一段时间上的瞬态吸收光谱。

## 2.7 电子的能量传递<sup>[24]</sup>

### 2.7.1 理论

我们用  $D^* + A \rightarrow D + A^*$  来描述电子的能量传递,在始态,供体 D 是电子激发态;在终态,供体返回到一个较低的

电子状态,而受体 A 则跃迁到较高的电子激发态,被传递的激发用星号表示。能量传递是一个一步的非辐射过程(不涉及任何光子),过程中同时发生  $D^* \rightarrow D$  和  $A \rightarrow A^*$  的跃迁、这需要供体和受体之间有某种相互作用。

辐射性的(“迁移的”)激发传递是一个两步的过程,在这种过程中,供体发出一个光子并被受体吸收。这节将不讨论这种传递,这并非它不重要(我们的生存依赖于能量从太阳到光合作用生物的传递),而是因为它容易理解。辐射性的激发传递对非辐射性的激发传递的相对几率与很多因素有关,但一般认为非辐射性的激发传递在生物系统中是更可能的过程,当然也有一些相反的情形,例如,在雄萤火虫寻找雌萤火虫的过程中就包含着辐射性的激发传递(生物荧光,请参阅第 14 章)。

激发的传递是一种共振过程,供体 ( $D^* \rightarrow D$ ) 和受体 ( $A \rightarrow A^*$ ) 内总的跃迁能量的变化是相同的,因此,受体内的跃迁所涉及的电子能量的改变必须等于或小于供体内的改变,其能量变化上的任何差别都可以由供体和受体中包含的振动能级所引起(图 2-11)。传递的能量对应于相应的供体发射谱和受体吸收谱上共同都有的一个频率,它是这两个谱重叠区域内的一个频率(图 2-11),随着光谱重叠区的增大,可能的耦联跃迁的数目亦增加,从而使传递几率增加。

把始态和终态联系起来的供体和受体之间电子的相互作用通常分成两项,叫做库仑作用和交换作用。可以证明库仑作用正比于 [公式 (2-25)] 供体和受体的相应的跃迁偶极矩  $M_D$  和  $M_A$  的乘积(参阅 2.3.6),跃迁矩的平方正比于在孤立的供体和受体中光学跃迁的强度,于是,根据适当的光谱可以很好地算出库仑作用。偶极子的库仑作用随供体和受体间距离的三次方减小[公式 (2-25)],当供体和受体中的跃迁都很

强时(允许跃迁), 这种相互作用起主导作用, 它可以使大到 10nm 的距离上发生传递:

$$k_{et}^* (\text{偶极子库仑作用}) \propto \left( \frac{M_D M_A}{R^3} \right)^2 \quad (2-25)$$

Förster 把公式(2-25)中的参数与实验可以得到的参数连系了起来, 在公式(2-26)中,  $\bar{\nu}$  是波数:

$$k_{et}(\text{Förster}) = \frac{8.8 \times 10^{-25} \kappa^2 \Phi_D}{n^4 \tau_D R^6} {}_g F_D(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (2-26)$$

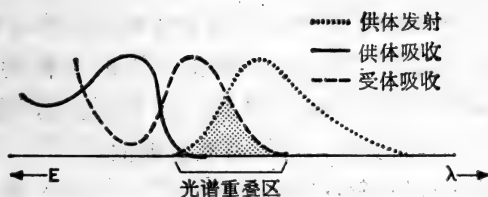
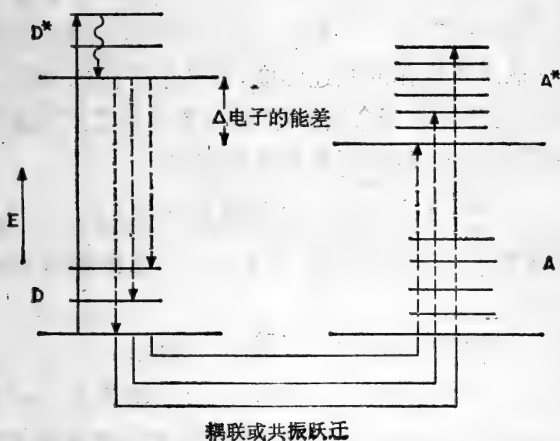
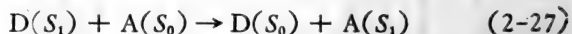


图 2-11 具有电子能差  $\Delta E$  的供体-受体对的耦联跃迁以及它们与供体发射谱和受体吸收谱间重叠区的关系。

\* $k_{et}$  是激发传递的速率常数。——译者

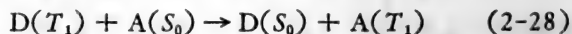
${}_gF_D(\bar{\nu})$  是供体发射的谱,  $\epsilon_A(\bar{\nu})$  是受体吸收的摩尔消光系数,  $n$  是溶剂的折射率,  $\kappa^2$  是说明偶极子相互作用几何关系的方位因子,  $\phi_D$  是无受体时供体发射的量子产额,  $\tau_D$  是供体的发射寿命(s), 而  $R$  是供体和受体生色团之间的距离(cm)。于是, 传递速率正比于供体和受体中光学跃迁的强度, 因此, 激发通过这种机制传递的选择定则与光学跃迁的选择定则相同。传递效率(在供体寿命期内传递的数目)可以方便地用半数激发发生传递时的临界距离  $R_0$  来表示(这时传递速率等于孤立状态下供体的衰变速率,  $k_{et} = \tau_D^{-1}$ ), 传递效率与供体的跃迁强度无关, 它仅仅取决于受体的跃迁强度, 这是由于供体中较弱的跃迁被它较长的激发态寿命所补偿(如果忽略非辐射退激的话)。

如果用自旋态表示, 下面型式的传递:



或者所谓单线态-单线态传递, 是完全为库仑机制和 Förster 机制所允许的。

下面的过程叫做三线态-三线态传递:



它是被 Förster 机制双重禁止的, 但是它可以靠交换作用发生。交换作用与供体和受体波函数(电子轨道)在空间的重叠有关, 因此它是非常短程的作用(碰撞距离上的作用)。分子间交换作用的大小不容易与供体和受体的光学特性连系起来, 如果供体和受体内的跃迁都是自旋禁戒的话, 则偶极子-偶极子项非常小, 而交换项可能占支配地位。

对于交换较弱的激发传递, 三线态-三线态和单线态-单线态的传递当然是自旋选择定则所允许的, 像芳香烃那样的分子间, 交换作用的大小对最靠近的两个分子来说在  $10\text{cm}^{-1}$  的数量级, 如果自旋允许的话, 这样大小的交换作用足以造成

很快的传递, 即  $10^{-10}$ — $10^{-11}$  s。当供体-受体的距离增大时, 传递速率非常迅速地下降, 大约 0.1nm 下降 100 倍。为了保证溶液中两个分子在处于碰撞复合体(碰见)的时间内发生传递,  $10^{10}$ — $10^{11}$  s $^{-1}$  的传递速率是足够的。

### 2.7.2 唯象的分类

把非辐射性激发传递分为三种唯象类型是有益的:

(1) 短程碰撞传递; 它要求供体和受体接近到碰撞直径的范围内, 如果只有交换作用机制起作用的话, 就是这种情况。如果溶液中供体和受体之间的每一次碰撞都导致传递, 则传递速率就是扩散控制的速率, 其速率常数是  $5 \times 10^9$  l·mol $^{-1}$  s $^{-1}$  左右。

(2) 长程一步传递; 它在比分子直径大的距离上发生, 这种传递必须靠库仑作用的偶极子-偶极子(Förster)机制。对溶液里的供体和受体分子来说, 这种长程传递的速率可以超过扩散控制速率。

(3) 长程多步传递; 如果供体分子的浓度很高, 可以发生这种传递。如果供体分子能充分地相互作用, 它们之间也可以发生有效和快速的激发传递, 最后再从一个供体分子传给足够靠近它的一个受体。

如果供体和受体都是静止不动并相距较远的话, 则只有长程一步或长程多步传递两种方式才是可能的, 事实上大多数 Förster 型单线态-单线态传递都是供体和受体彼此之间相对地静止不动的情况, 例如, 同一分子两部分的生色团之间的单线态-单线态传递就是如此。用测量单线态-单线态的激发传递的办法来确定特殊生色团(例如同一大分子上的两个基团)之间的距离是行不通的, 这是因为  $\kappa^2$  不准确, 又不太清楚供体和受体的相对运动究竟有多快, 从而不能算出  $\kappa^2$  的合适

的平均值。

当库仑作用变弱到 Förster 临界距离与碰撞直径差不多大小时,溶液中单线态-单线态激发传递的速率不可能比扩散控制速率快,在这种情况下,估计交换机制对传递速率贡献很大。无论从那一点看,三线态-三线态传递必须要在供体和受体之间发生碰撞,因此这种过程的速率不会超过扩散控制速率。

### 2.7.3 溶液中双分子的激发传递

在溶液中,单线态-单线态传递过程和三线态-三线态传递过程是最常见的,正如预计的那样,三线态-三线态传递的速率不超过扩散控制的速率,只有当供体的三线态能级比受体的三线态能级高几 kcal/mol 时,传递速率才能达到扩散控制的数值。吸热的传递发生在活化能等于供体和受体间能量差的情形,在遇到特殊和不常见的几何条件时会出现反常的速率。在去空气的溶液中三线态的寿命一般较长( $10^{-6}$ — $10^{-3}$  s),当猝灭剂的浓度达到  $10^{-4}$ — $10^{-6}$  M 时,三线态可以把激发有效地传递给适当的猝灭剂。

如果长程库仑作用的机制起作用的话,放热的单线态-单线态传递能以快于扩散控制的速率进行。如果长程库仑作用进行得太慢,则只发生碰撞传递,这时最大的传递速率就是扩散控制速率。由于单线态的寿命较短,仅 1—100 ns,为了有效地传递就要求受体有较高的浓度,即  $10^{-1}$ — $10^{-3}$  M。

### 2.7.4 生物系统中的电子能量传递<sup>[25]</sup>

在生物系统中,人们往往看到一些潜在的供体和受体处在移动和转动受到限制的环境里,如果供体和受体不能在激发的供体的寿命以内通过扩散接近到足以发生传递的程度,对移动的限制就使激发传递的效率降低。这种对大分子运



动的限制给自由扩散的小分子(如氧)以很大的便利。

在蛋白质当然也在核酸中,处于低激发态的单体单元靠得很紧,因此可以预期它们之间的激发传递是快的。芳香氨基酸色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)发荧光,并能交换单线态的能量,单线态能量的排列顺序是  $\text{Phe} > \text{Tyr} > \text{Trp}$ ,这也是预期的激发传递的方向。对于这些基团的每一对之间单线态从高到低的激发传递,如果传递效率为50%,则 Förster 距离( $R_0$ )为 1.5nm 量级,它和蛋白质的半径差不多。不难证明在蛋白质里确实存在这样的传递,即使激发光主要被苯丙氨酸或酪氨酸所吸收,很多含有色氨酸的蛋白质也主要表现出色氨酸的荧光,这就说明了是这种传递。根据传递效率的测量,有可能估计出蛋白质中这些氨基酸之间的距离,用辅基作为供体和受体,大大增加了利用激发传递测定分子内距离的可能性。

蛋白质中芳香氨基酸之间的三线态-三线态传递应该比单线态-单线态传递更多地受到限制,这是因为只有当两个生色团实际上是最靠近的邻居时,三线态-三线态的传递才能有效地进行。含色氨酸的蛋白质主要显示色氨酸的磷光,但这可能是由于单线态-单线态传递过程把单线态定域在色氨酸上的缘故,系统间渡越以后,由于色氨酸的三线态激发能在氨基酸中是最低的,所以三线态的激发就保持在色氨酸上。

在核酸里,单体单元(碱基)彼此挨得很紧,它们的距离在 DNA 里大约是 0.4nm,因此激发的迁移看来应该是很强烈的,确实,相邻碱基之间电子相互作用的数值是很大的。但是看来核酸内碱基之间单线态和三线态激发的传递都只是短程的,数量级上最多是 10 个碱基。最靠近的相邻碱基的单线态的传递速率很快(对 Förster 型传递为  $10^9 \text{ s}^{-1}$  左右),但是,通过一些竞争途径使电子激发能弛豫的过程往往更快,这就使

实际上的传递效率降低了。

根据哪两个碱基是供体和受体的不同，室温下相邻碱基之间三线态-三线态传递的速率可能有几个数量级的变化，可从  $10^4 \text{ s}^{-1}$  变到  $10^9 \text{ s}^{-1}$ ，而在室温下单体三线态的寿命却是  $10^{-6} \text{ s}$  左右，因此，在三线态的寿命以内某些相邻碱基之间的传递发生不了，而另一些则可发生多次。由于妨碍传递的那些相邻碱基的组合经常出现，所以三线态的激发迁移大受限制。在像多聚腺苷酸这样的同聚核苷酸中，三线态可迁移几百个单体单元，在碱基基本上是随机分布的多聚体中，即使短到 10 个碱基左右的短程迁移，也能使激发固定在三线态能量最低的碱基上，例如 DNA 里的胸腺嘧啶。

虽然与生物分子有关的电子能量传递的例子很多，但是与活体内光生物学过程有关的例子有文献证明的却不多，最有名的一个例子就是叶绿体内天线叶绿素分子之间激发的迁移，这种迁移一直进行到能量最终被传给反应中心里的特殊叶绿素分子为止(参阅第 13 章)。许多光动力作用类型的损伤过程涉及到激发能从敏化染料到氧的传递(参阅第 4 章)，这种过程无疑会发生在活体内，但是目前还没有任何直接的证明。酮敏化剂已被用来在细菌、噬菌体和培养的哺乳动物细胞里诱导嘧啶二聚体的形成(参阅 5.2.4)，这必然涉及到三线态激发从酮到 DNA 的传递。

海蜇 *Aequorea aequorea* 在受到惊动时发出蓝绿色的生物荧光(参阅 14.6)，最先产生的激发态产物是和叫做 aequorin 的一种蛋白质相连系的，它发出蓝色的化学荧光。发蓝-绿荧光的蛋白质可以从海蜇的发光器官里提取出来，但发光器官并不显示化学发光。根据 Förster 理论，如果发蓝-绿荧光的蛋白质与发光器官靠得很近，激发就可以从发蓝-绿荧光的蛋白质的生色团传递给发光器官。

## 2.8 练 习

(1) 如果表面上的光强是  $1000 \text{ W/m}^2$ \*, 用波长  $400 \text{ nm}$  的光照射  $1 \text{ h}$ , 有多少光子射在  $1 \text{ cm}^2$  的表面上?

(2) 画出图 2-12 上所示吸收和发射光谱的分子的三能

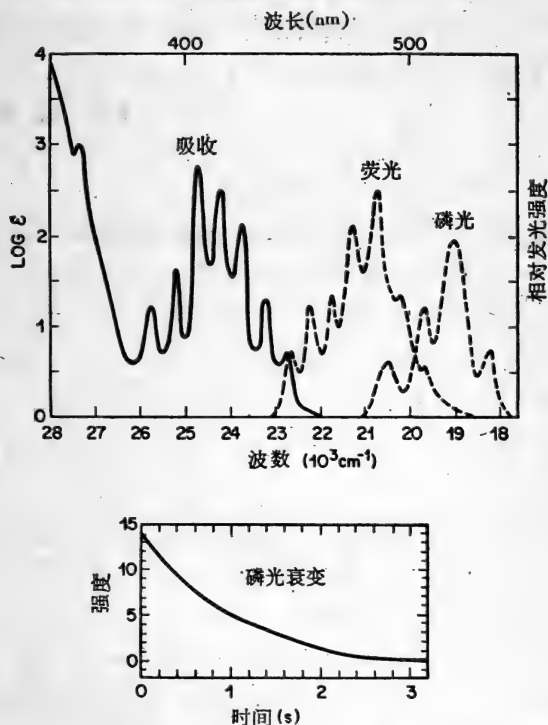


图 2-12 上图: 一种有机化合物的吸收(ABC)、荧光(FLUOR)和磷光(PHOS)光谱, 吸收谱( $\log \epsilon$ )标度在左边, 而发射谱(相对强度)标度在右边。下图: 该化合物的磷光衰变(强度~激发光消失后的时间)。

\*此处原文中所给的单位是  $\text{J/m}^2$ , 是错误的, 译文中改正为  $\text{W/m}^2$ 。——译者

级 Jablonski 图, 它的荧光、磷光、系统间渡越和内转换的速率是多大?  $\Phi_p = 0.2$  和  $\Phi_{isc} = 0.6$ ; 图 2-12 上还给出了磷光的衰变曲线。

(3) 己烷溶液中三苯烷三线态的单分子衰变速率常数  $k_d$  是  $2 \times 10^4 \text{ 秒}^{-1}$ , 猝灭 50% 的三苯烷三线态所需萘的浓度是  $2 \times 10^{-5} M$ , 试问双分子猝灭速率常数是多少?

(4) 由 1,2,5,6-二苯蒽(图 2-1)到卟啉(图 2-7) 能发生单线态-单线态的电子能量传递吗? 试解释。

(沈 炯 译)

## 第3章 光 化 学

Nicholas J. Turro

(哥伦比亚大学化学系)

Angelo A. Lamola

(贝尔实验室 新泽西州默里希尔)

3.1	序言 .....	77
3.2	一些常见的总光反应 .....	80
3.3	有机分子的原初光反应 .....	84
3.4	光化学中的结构-反应性关系 .....	88
3.5	光化学的另一种观点 .....	92
3.6	量子产额和动力学 .....	93
3.7	作用光谱 .....	96
3.8	光敏化作用 .....	98
3.9	小结 .....	102
3.10	练习 .....	103

### 3.1 序 言

光生物反应是指通过所吸收的光能的作用对生物系统的某些化学修饰,而把光照射化学系统所产生的化学反应习惯上称作光化学反应,光化学反应的研究即构成所谓光化学科学。在最近二十年间,由于许多能直接测量反应中间产物和处于电子激发态分子的技术的出现,光化学反应这一术语有了更专一的定义:光化学反应开始于反应物的某一电子激发

态,并以第一个基态产物的出现而告终。这就是说,光化学反应是由那些不返回到原来分子的电子弛豫过程构成的<sup>[1-3]</sup>。根据这个定义我们看到,光化学反应与通常的热反应的区别在于光化学反应总是涉及到具有激发电子的分子。

在第2章里已经指出,一个分子吸收一个光子将使该分子上升到一个电子激发态,从而开始一系列使这个激发分子的能量不断降低的事件。除了使激发分子回到它起始基态的辐射及非辐射(所谓光物理的)过程之外,处于电子激发态的分子还可以经过若干键断裂或键形成(所谓光化学的)过程而弛豫。相对于基态而言,如果一个旧键被完全破坏或完全形成一个新键,这时就可以说激发分子进行了一次光化学反应(通常叫做原初光化学过程)。有时一个稳定的或不易变化的产物是光化学反应的直接结果,这样的反应叫做协同的光化学反应,即从激发态到最终产物的过程中没有任何中间化学产物出现。但是,大多数光反应生成有反应活性的中间产物

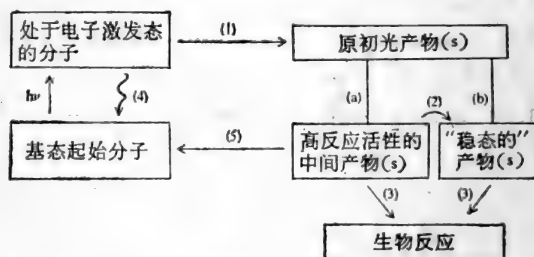


图 3-1 激发态和光产物之间的关系。光激发分子导致: (1) 原初光化学产物,它本身可能是最终产物(b),或者是在暗处发生转变的高反应活性的中间产物(a);(2)最终产物。生物反应是通过最终产物起作用的(3),虽然有时应该考虑到高反应活性的中间产物也是起作用的;过程(4)和(5)分别为返回基态的电子弛豫和化学反应,它们使过程回到起始分子。

(如,自由基、双自由基、离子或其他不稳定的产物),它们是不稳定的,并将进一步反应,通过一些继发(热)反应而生成最终产物。图 3-1 中的流程图总括了这些概念和定义,这种光化学反应的观点并不意味着不重视可能来自光化学反应产生的中间产物的最终产物。相反,这些最终产物往往是导致几乎总在比光化学反应长得多的时标上发生的生物反应的原因。正是这些最终产物的分离和特性鉴别构成了分子光生物学的骨架。然而,把(原初的)光化学反应与光化学产生的产物的(继发的)热反应加以区别是很有好处的。例如,影响原初光化学事件的因素常常与影响继发反应的因素不同,这就造成了许多可能的途径来控制化学过程。正如下面将会看到的,把原初和继发反应分开对光化学反应的分类是有益的。

为便于分析处理,把从光的吸收开始而以形成稳定产物告终的化学过程叫做总的光化学反应。而总的反应中,与激发态分子有关的那一部分,即光化学反应本身则叫做原初光反应或原初光化学过程。

虽然有机分子不同的总光反应数目很大,而为有机分子所共有的原初光化学过程的数目却并不多。在以后各节将讲述一些重要的原初光反应,并通过实例来说明如何能由这些控制化学过程起始步骤来解释某些总的反应。

图 3-2 是在对数座标上给出从  $10^{-15}$ — $10^5$  s 的光生物中所关心的那些过程的时序。表观光生物学家记录的是光照后从几毫秒(ms)到也许要数年才发生的生物效应(例如阳光诱发人的皮肤癌),并把这些效应与各种实验参数,特别是光的波长和注量联系起来。分子光生物学家则把生物反应与生物化学事件,并最终与可观测的光产物联系起来。为了彻底阐明其机制,就需要了解吸收光的分子的光物理和光化学弛豫过程。只有在弄清了这一完整的构图之后,才能确定出促进、

改变或阻止某一光生物反应的最有效的方法。

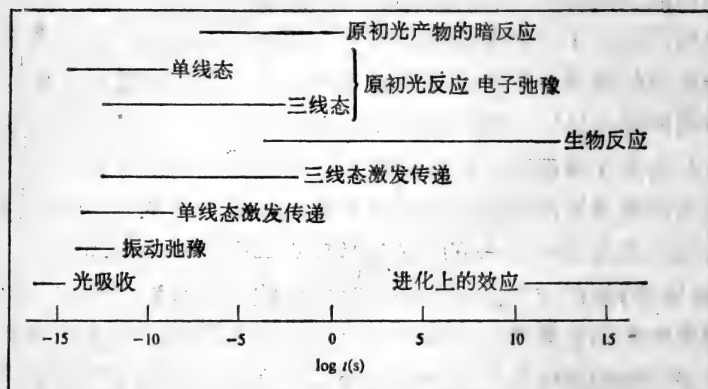
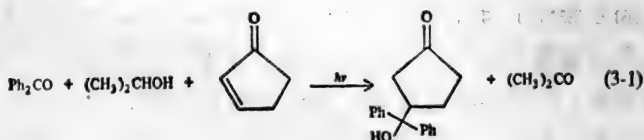


图 3-2 在光物理、光化学及光生物学上的时间标度

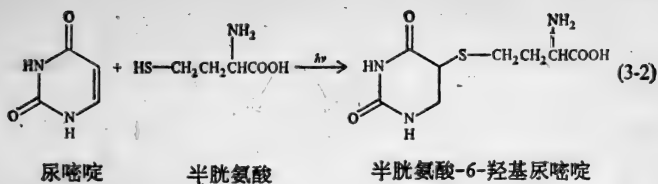
### 3.2 一些常见的总光反应<sup>[4-9]</sup>

从现象学的观点来看，对某些最常见的有机的光反应作下面的分类是颇为方便的。每种反应类型给出两个例子，其一涉及有生物学意义的分子，另一个则是某些较简单的有机分子。这样读者就可以看出，往往有一些简明的类似之处可以有助于生物分子的光化学研究。

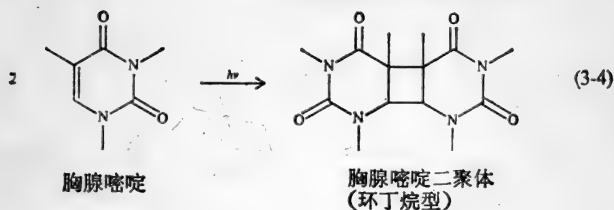
(1) 不饱和系统的线性加成(也叫做还原加成):



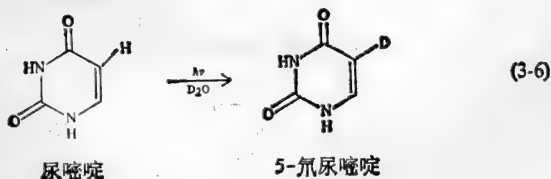
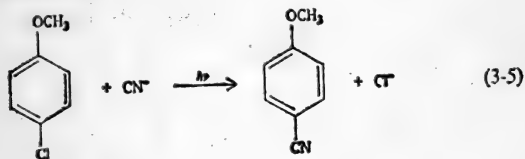




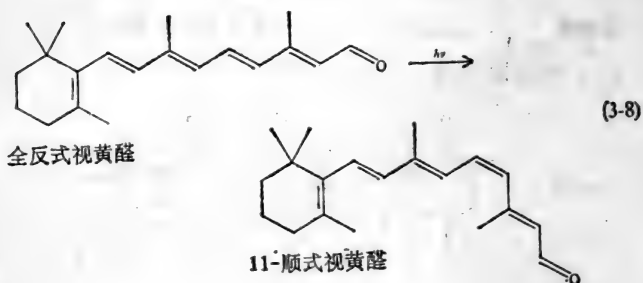
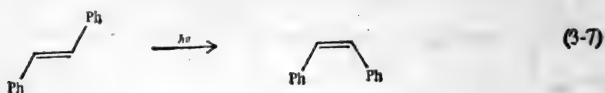
(2) 不饱和系统的环加:



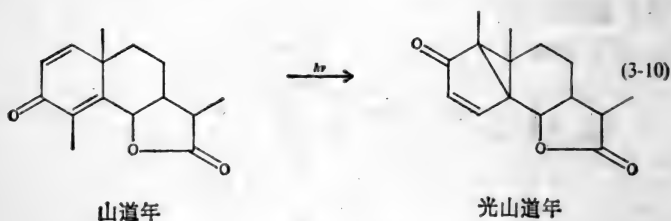
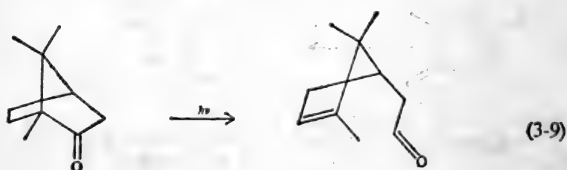
(3) 取代反应:



(4) 顺反式异构化:

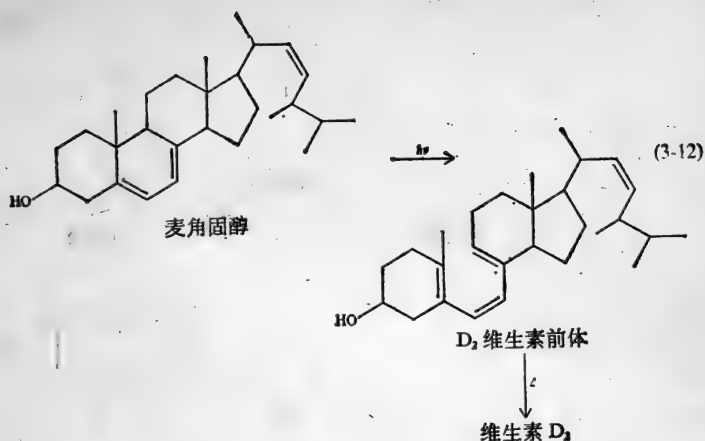


(5) 结构重排(骨架重排):

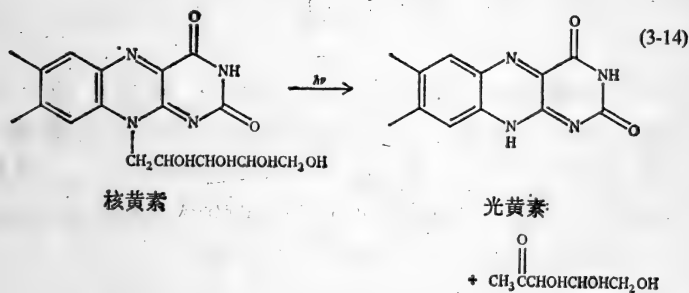
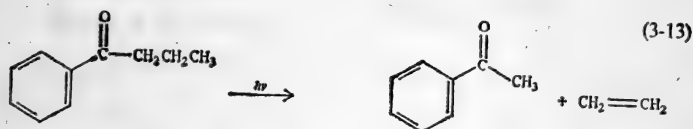


(6) 结构重排(电循环或价键的重排):

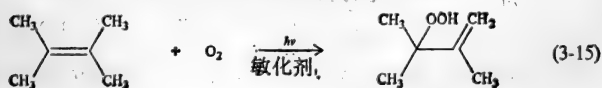


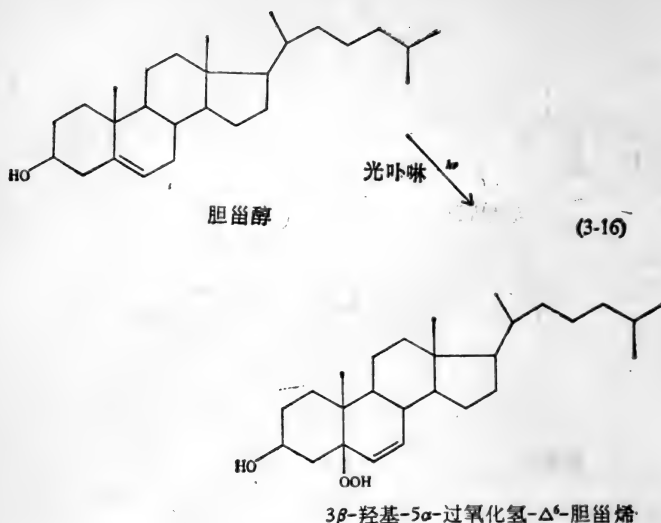


(7) 裂解:



(8) 光氧化:





### 3.3 有机分子的原初光反应

常见的原初光反应可以分为两大类型：①内在单分子型；②内在双分子型。这种区分的基础在于光反应主要是在一个电子激发的生色团内发生呢，还是另外有基态分子也参与了光反应过程？下面列出八种最常见的原初光化学过程。

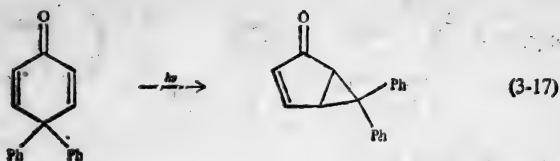
内在单分子的和协同的原初光化学过程：

(1) 顺反式异构化[见反应式(3-7)和(3-8)]。

(2) 电循环型的键重排[见反应式(3-11)]。这种原初反应型涉及某些单键和双键的协同重组(参阅下文)。

(3) 所谓Σ型的键重排。这种反应类型涉及到分子内某些原子或基团由一种单键键合方式变成另一种单键键合方式的协同重组。在分子内还可能伴随有其他键合方式的变化。

例如:



导致高反应活性中间产物形成的内在单分子型

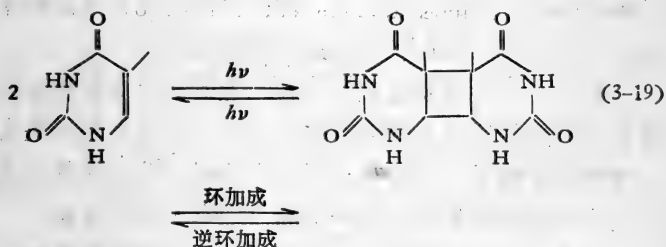
(4) 简单的均裂键劈开, 即一个单键劈开变为两个自由

基:



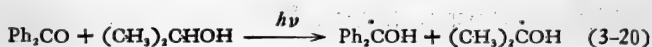
内在双分子的和协同的原初光化学过程

(5) 环加成(和逆环加成), 即两个组分加成形成一个环  
(或一个环劈开为两个组分):

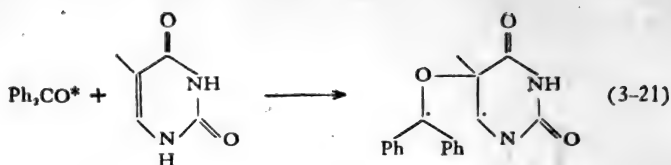


导致高反应活性中间产物形成的内在双分子型

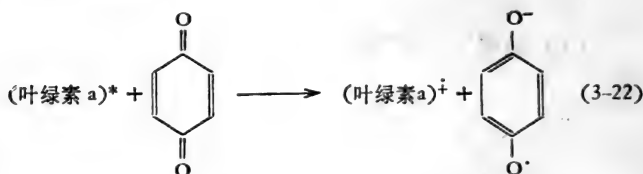
(6) 抽氢:



(7) 两步加成为不饱和系统之第一步:



(8) 电子传递:

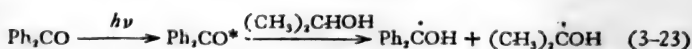


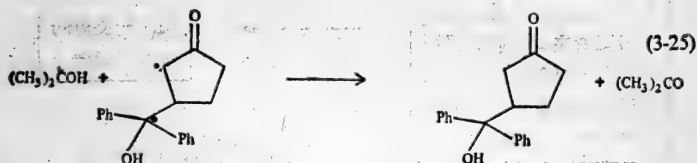
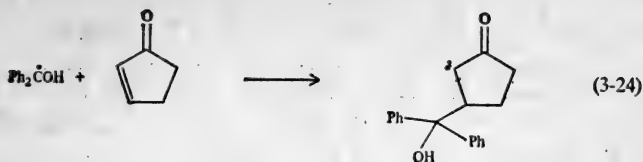
这些原初反应中每一种的推广和举一反三往往会足以对有机化合物的大多数已知的总光反应提供一个适当的机制。在把这八个原初光反应用于机制分析时，将要用到两个一般的规则:

规则 1: 除顺-反式异构化外，只有激发单线态的分子进行协同的或一步的总光反应。注: 协同的光化学过程中只有顺-反式异构化可以由三线态以及单线态发生。

规则 2: 由原初光化学过程产生的高反应活性中间产物导致的最后的反应产物由这些中间产物的继发反应决定。注: 在预测或解释最后的光化学反应产物时，我们必须考虑由原初光化学过程产生的中间产物的一切有可能的反应。

在 3.2 中的实例给出了某些总光反应的可能机制。对一个看来复杂的反应，作线性加成[反应式(3-1)]的分析就变得简单了。最有可能的原初过程是由光激发的苯酮从异丙醇抽提氢而产生联苯酮自由基，然后再与环戊酮加成:





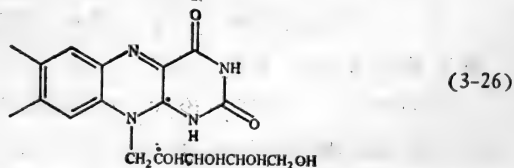
通过协同的(单线态)机制或者通过三线态苯酮对胸腺嘧啶的攻击形成一个中间产物的途径[反应式(3-21)]都可以发生反应式(3-3)的环加反应。由实验资料知道,单线态  $\text{Ph}_2\text{CO}$  的寿命太短而不能参与双分子的光反应。因此可能涉及在反应式(3-21)所示的原初过程。

(3-7) 和 (3-8) 式中的反应可能是单线态或者三线态的顺-反式异构化。

(3-9)式里的反应包括双自由基中间产物的形成[参阅反应式(3-18)]。

(3-10)和(3-12) 式中的反应分别是  $\Sigma$  型和电子重排型,两者可能都是单线态反应。

(3-14)式中的反应可能是经由下面给出的双自由基进行的,这个双自由基是由分子内部的氢原子抽提产生的:



总结起来,在图 3-3 中给出的图解简要地说明了用合理

化和预测的方法来分析有机光反应的一个一般框架。

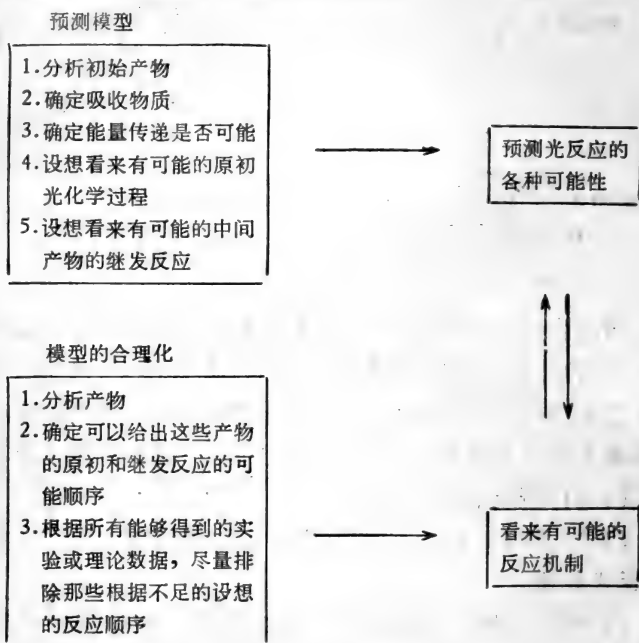


图 3-3 求出光化学反应机制的图解

### 3.4 光化学中的结构-反应性关系

由于原初光化学过程的数目是很少的，因此人们可能要问：在光化学中是否存在一般的结构-反应性关系呢？对这一问题的回答是肯定的。

正如在 2.3.5 中所讨论的一样，通常遇到的有机分子的激发态可以根据它们的总电子自旋分为单线态或三线态，并根据它们的电子构型分为  $n, \pi^*$  态和  $\pi, \pi^*$  态。关于单线态和三线态以及  $n, \pi^*$  态和  $\pi, \pi^*$  态的反应可以作一些一般的论



述。

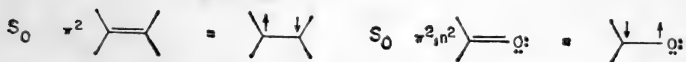
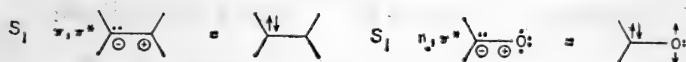
关于反应活性的第一个公理与对应于相同电子构型的单线态和三线态之间的区别有关。

公理 1: 如果反应中涉及的关键价电子成对地移动, 则单线态易于反应, 而如果反应中涉及的关键价电子单个地移动(类似自由基那样), 则三线态易于反应。

关于反应活性的第二个公理与对于某一状态的“最适的”一个电子构型和该状态的反应类型之间的相关性有关。

公理 2: 对一给定的激发态分子所预期的化学反应往往可以预测, 其办法是检查与电子构型对应的一个“最适的”价键, 所预计的化学反应与公理 1 一致。

为了说明这两个公理的应用, 读者可参考图 3-4, 图中所示为两个原型系统, 即乙烯和丙酮。对于乙烯的最低激发单线态及三线态 ( $S_1$  和  $T_1$ ) 来说, 最适的一个电子构型是  $\pi, \pi^*$



乙烯

丙酮

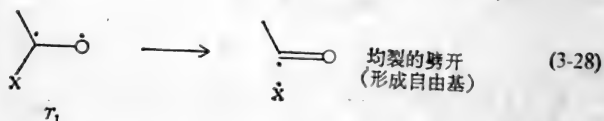
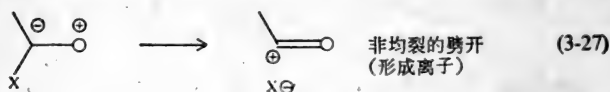
图 3-4 描述乙烯和丙酮的  $S_0$ 、 $S_1$  及  $T_1$  状态的“最适的”一个价键结构。对  $S_1$  态的乙烯所示仅是两个等价的共振结构中的一个。对于丙酮, 氧原子下方的电子被看作  $n, \pi^*$  态中的  $n$  电子。氧原子上方的电子代表  $\pi$  电子或  $\pi^*$  电子。高能态的间距未按比例增大。

构型。根据公理 1 和公理 2, 离子价键结构  $\bar{\text{C}}\text{H}_2-\overset{+}{\text{C}}\text{H}_2 \longleftrightarrow \overset{+}{\text{C}}\text{H}_2-\bar{\text{C}}\text{H}_2$  (在两个相同结构之间的共振) 对应于  $S_1$ , 而双自由基结构  $\dot{\text{C}}\text{H}_2-\dot{\text{C}}\text{H}_2$  对应于  $T_1$ 。

对于丙酮的  $S_1$  和  $T_1$  态, 最适的一个电子构型是  $n, \pi^*$  构型。根据公理 1 和公理 2, 离子结构  $(\text{CH}_3)_2\bar{\text{C}}-\text{O}^+$  对应于  $S_1$ , 而双自由基结构  $(\text{CH}_3)_2\dot{\text{C}}-\dot{\text{O}}$  对应于  $T_1$ 。

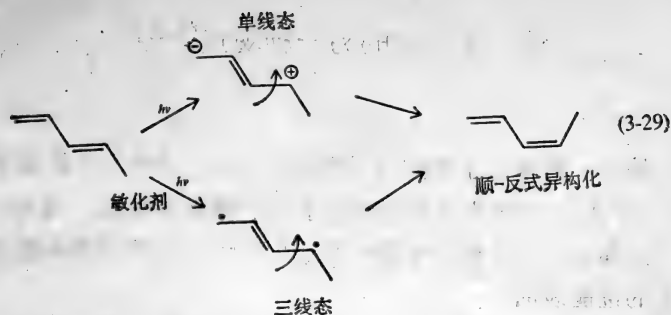
把这两个公理推广到包括共轭结构在内的其他分子是相当容易的。

现在可以把前面讨论过的有关的原初光化学反应与价键结构联系起来了, 即可以得出结构-反应性关系了。作为第一个例子, 让我们看一下酮。在八个原初光化学反应中, 我们预期丙酮只参加非协同反应, 即使在  $S_1$  态也是如此, 因为  $S_1$  的  $n, \pi^*$  构型限制了为形成与它相连的键所需轨道同时重迭的可能性, 而形成这个延续的键是协同反应的一个必要条件。因此我们预期酮只参加内在单分子过程的键劈开反应, 即:

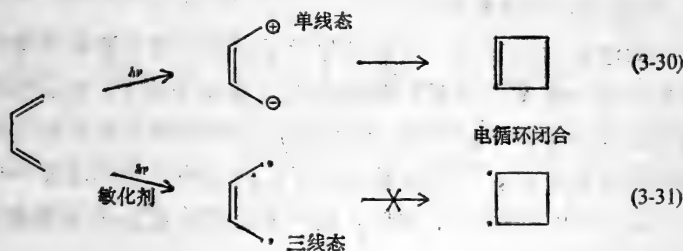


作为第二个例子, 让我们看一下共轭二烯。我们预料 1, 3-丁二烯具有参加八个原初光化学反应中的大部分反应的可能性, 这要依其反应条件而定。例如, 顺-反式异构化 (3-29) 就是预期的  $S_1$  和  $T_1$  两种状态都会发生的反应。

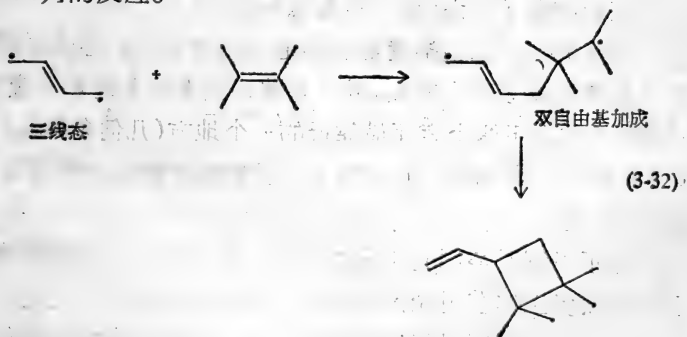
由于它们一般都是协同的反应, 因此  $S_1$  态可以发生电循



环反应, 而  $T_1$  态则不行。因为自旋必须守恒, 所以  $T_1$  的环化将会产生较高能的三线态[反应式 (3-31)];  $S_1$  的环化产生较低能的基态产物[反应式 (3-30)]。



应该注意的是  $T_1$  相对来说比  $S_1$  容易发生双分子环加成反应, 因为  $T_1$  的寿命较长, 这就使它有更多的机会发生[反应式 (3-32)]的反应。



### 3.5 光化学的另一种观点<sup>[3,10]</sup>

处于一特殊电子态的分子可以以多种几何形状(其核的构型)存在。每种几何形状对应于一个特定的位能。对每一电子态而言,其位能对核的构型(几何形状)所作之图叫作该分子的位能表面。

根据反应过程是发生在一个位能表面(即:在一种电子态)上,还是涉及从一个表面或电子状态转为另一个表面或电子状态,我们可以对光化学反应加以分类,前者叫作绝热过程,后者则叫作非绝热过程。

对溶液中的反应,绝热光化学反应限于其主要化学变化发生在同一激发态表面的那些反应。双原子分子,如  $I_2$  的光分解就是一个例子。事实上,所有已清楚的例子都包括某些结合或离解反应,例如涉及到质子化或去质子化的激发分子的反应( $RH^* \longrightarrow R^* + H^+$ ),通常该反应的逆反应在基态很快发生。

大多数光化学反应都是非绝热的。化学变化是电子退激过程的一部分,换句话说,化学变化是从一个电子激发态变成一个较低电子状态(通常是基态)的结果。

许多光反应都包括绝热和非绝热两种变化。绝热过程包括在某激发态表面上移动,并一直移动到发生非绝热反应(电子退激)的上下两个表面最靠近的一个地方(几何条件)。图 3-5 给出了一个例子,它代表了沿反应路径通过一组假设表面的横切面。

为了了解对控制光化学过程很重要的位能表面的特性,目前有很多工作在用光谱学数据(吸收和发射谱,光电子谱等)、分子轨道计算以及对称理论来描绘光化学活性高的化合

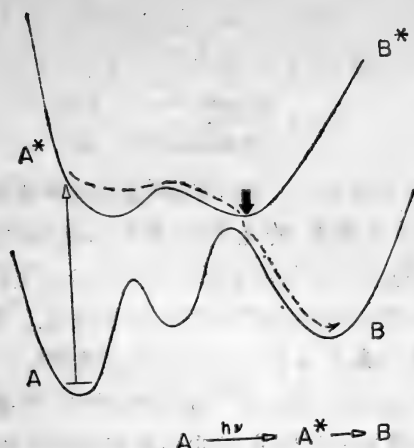
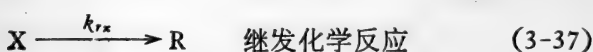
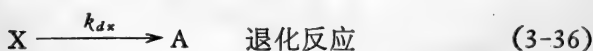
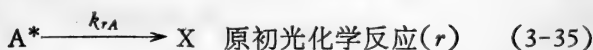
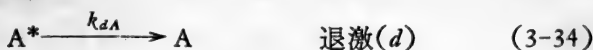


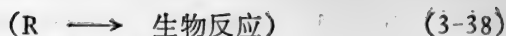
图 3-5 对一个复杂的光化学原初过程  $A^* \rightarrow B$  的假设路径。起始分子 A 跃升到某一激发态表面，在此表面上越过一个低的位垒迅速地移动，使该分子达到迅速发生电子退激的一点（粗箭头所指），随后沿反应路径进一步移动，直至热稳定的基态产物 B。

物的位能表面图<sup>[10]</sup>。

### 3.6 量子产额和动力学

让我们看一个典型的总光化学反应，其中可测量的产物(R)由光化学反应产生的中间产物(X)的暗反应所产生：





产物 R 的量子产额 ( $\phi_R$ ) 是(参阅 2.4.3):

$$\phi_R = \frac{\text{产生的 R 的分子数}}{\text{A 吸收的光子数}} \quad (3-39)$$

在一个典型的实验中,一般可以测量的是产生的 R 的分子数和样品吸收(特定波长)的光子数。根据样品吸收的光子数、A 的吸收谱、A 的浓度及其消失的时间过程,以及样品中存在的可以吸收激发光的其他物质的吸收谱和浓度,我们通常可以计算在实验进行期间 A 分子吸收的光子数<sup>[11]</sup>。

量子产额是表征光化学反应最重要的一个参数。知道了它的值,我们就能通过限定光的注量来控制产物的量。量子产额在阐明光产物形成机制上也是极有价值的。但是,对于一组实验变量来说,知道量子产额尚难于详尽地确定其机制。

在机制研究中,要确定量子产额(或某些直接正比于量子产额的量)对一些实验参数,例如光的强度、反应物的浓度、溶剂及温度的依赖关系。只有这样我们才能着手阐明在光吸收和可测量的产物形成之间发生的各种中间过程。在为了寻找可以给出关于中间产物信息的结构-反应性关系的某些推理方法中,另外一个办法是改变其中一个反应物的结构,例如改变上面所给的反应方程组中 A 的结构。为了避免对光化学反应活性的错误结论和推断,取得总过程中关键中间产物产额的定量信息是必不可少的。只要在量子产额的表达式中引入中间过程的效率,这一点就更清楚了。取上面给出的例子,则:

$$\phi_R = (X \longrightarrow R \text{ 的效率})\phi_X \quad (3-40)$$

$$= [k_{rx}/(k_{rx} + k_{dx})]\phi_X \quad (3-41)$$

进一步展开:

$$\phi_R = \phi_A \cdot [k_{rA}/(k_{rA} + k_{dA})][k_{rx}/(k_{rx} + k_{dx})] \quad (3-42)$$

如果  $A^*$  不是由于吸收光子直接达到的状态, 例如它是一个三线态, 那么  $\phi_{A^*}$  本身可以用光物理过程的相对速率来展开。

在总的反应进程中中间产物可能进行的几个过程中, 其中一个过程的速率的增加或减小都可以造成  $\phi_R$  数值的增大或减小, 也就是总的量子产额与各竞争过程的速率常数的比例有关。因此,  $\phi_R$  数值的改变不会只一种解释。例如, 在同样的实验条件下  $A$  的一个类似物给出一个类似的光产物, 但是有较高的量子产额, 这可能是由于  $\phi_{A^*}$ 、 $k_{rA}$  或  $k_{rX}$  等的数值增加所造成, 也可能是由于较低的  $k_{dA}$  或  $k_{dX}$  值所致, 还可能是这两种变化结合在一起的结果。当然, 如果  $k_{dX}$  值减小从而使  $k_{rA}/(k_{rA} + k_{dA})$  的值增加, 也可以产生同样的结果。由此可见, 对于像  $A$  转变成  $R$  的总光过程来说, 反应活性(在这种情况下就是速率常数  $k_{rA}$ )的正确解释就需要测定中间产物 ( $A^*$  和  $X$ ) 的产额。

近年来建立了许多探测中间过程的方法。快速光谱技术, 如闪光光解(参阅 2.6.2) 就能直接观察到甚至很短寿命的中间产物, 并测出它们的产额和寿命。通过把特定的敏化或猝灭化合物引入所研究的系统, 可以获悉更多的信息。猝灭剂是阻断特定中间产物的化合物, 从而减小所要得到的产物的产额。如果已知猝灭作用的速率, 那么从量子产额的减少就可以计算出中间产物的反应速率(参阅 2.5.3)。敏化剂是能够增加特定中间产物产额的化合物, 这种中间产物通常是三线态分子(参阅 3.8), 因此增加产物的产额。敏化剂还可以完全改变一个光化学系统的总的化学反应过程。

要点重述: 一个总的光化学反应的量子产额是一个度量吸收光产生通常能容易测量的化学变化的效率的量, 同时也是用作表征反应的函数参数的量。但是一般说来, 最终

的量子产额和光化学反应活性(原初光化学过程的速率)之间并不存在一一对应的关系。导致高反应性激发态分子的所有阶段的效率的乘积、原初过程的效率、以及在原初反应和最终产物形成之间发生的所有阶段的效率一起给出最终的量子产额。为了预测实验条件的某些改变对最终的光化学量子产额上会有什么样的影响,我们必须考虑这种改变对反应序列中每一过程的影响。为了预测实验条件某些改变对光生物学反应的强度(相对于光的注量)上会有什么样的影响,我们还必须考虑这种改变对于在关键光化学产物的形成和生物反应的出现之间发生的每个相继阶段的影响。

### 3.7 作用光谱<sup>[12]</sup>

让我们看一下上一节里总的光化学反应  $A \xrightarrow{h\nu} R$ , 并进而认为在所研究的波长范围内只有起始物质 A 能吸收激发光。再假定用波长  $\lambda_1$  的单色光(很小的带宽  $\delta\lambda$ )照射 A, 用波长  $\lambda_2$  的光照射同样的样品。那末, 在一特定的强度  $I_1$  和照射时间  $t_1$  情况下, 波长  $\lambda_1$  的光产生的产物 R 的量  $N_1$  可由下式给出:

$$N_1 = I_1 t_1 \sigma_1 [A] \phi_1 \quad (3-43)$$

式中  $\sigma_1$  是在波长  $\lambda_1$  处 A 的吸收截面(此量正比于摩尔消光系数  $\epsilon$ );  $\phi_1$  是该反应的量子产额。当然, 假定被样品吸收的入射光的分数足够小, 以致于所有的 A 分子所“看到的”是相同的光强度, 还要假定在实验过程中只有一部分可以忽略不计的起始物质转化成为产物。对波长  $\lambda_2$  的光照亦有类似的情况:

$$N_2 = I_2 t_2 \sigma_2 [A] \phi_2 \quad (3-44)$$

如果这样进行这两次照射, 使  $N_1 = N_2$ , 那末:



$$I_1 t_1 \sigma_1 \phi_1 = I_2 t_2 \sigma_2 \phi_2 \quad (3-45)$$

因而

$$\frac{I_1 t_1}{I_2 t_2} = \frac{D_1}{D_2} = \frac{\sigma_2 \phi_2}{\sigma_1 \phi_1} \quad (3-46)$$

式中  $D = I t$  (总的光子注量)。比值  $D_1/D_2$  是在所述条件下引起光化学变化的波长  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  光的相对效率的量度。

我们可以测定在许多波长(具有相同的带宽)上光反应的相对效率。相对效率对波长作图就是产生 R 的作用光谱。在所作的假定下,作用光谱是  $\sigma(\lambda) \phi(\lambda)$  的相对值对  $\lambda$  的作图。如果量子产额  $\phi$  与  $\lambda$  无关,则作用光谱的形状与  $\sigma(\lambda)$  对  $\lambda$  的吸收光谱相同。因此,作用光谱对于测定在光化学或光生物过程中光吸收阶段所涉及的分子产物可能是一个重要的手段。

像量子产额一样,作用光谱提供了光诱发过程的一个重要的实验表征。例如,它能告诉我们什么样的光源会导致最有效的结果。但是,像量子产额一样,作用光谱可以给出关于复杂系统中的分子机制的有用信息,但有一定困难;只有在满足几个条件的情况下,某些光生物反应的作用光谱才真正代表关键发色团的吸收光谱。这些条件在 1.5.4 里已有评述。

尽管差别是完全可能的(参阅 1.5.4),但是仍有一些光生物反应的作用光谱与其关键组分的吸收光谱非常吻合,例如,杀死几种微生物的作用光谱就与 DNA 的吸收光谱吻合。对许多动物来说,其视觉反应的作用光谱都和其视觉色素的吸收光谱一致。

人的晒斑反应(滞后红斑)的作用光谱也许是一个最好的相反的例子。它在紫外区域有两个峰值,一个在 295nm,一个在 255nm,并在 280nm 附近有一最小值(图 3-6)。某些作者认为对 DNA 的光损伤在晒斑反应中是关键的一步。这就导出了把晒斑作用光谱解释为 DNA 的吸收光谱(以 260nm 附近为中心的一个宽谱带)和蛋白质的透射光谱(以 280nm 附

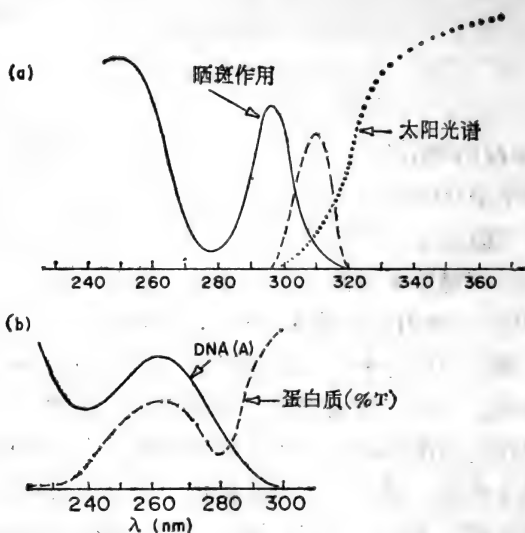


图 3-6 (a) 对称作晒斑的滞后皮肤红斑反应的作用光谱(实线), 在地球表面上的典型的太阳光谱(点线)以及两个谱的乘积或称效率谱(虚线); (b) DNA 的吸收光谱(实线)及含有芳香氨基酸的蛋白质的透射光谱(虚线)。在光源和 DNA 之间有一层蛋白质的情况下, 这两个光谱的乘积应该是 DNA 损伤的作用光谱。这个乘积的谱(未画出)类似于晒斑作用光谱。

近为中心的一个窄谱带)的乘积。起着内过滤器或屏蔽作用的蛋白质位于皮肤的角质(最上)层。

有时应该考虑作用光谱和光源(通常是太阳)光谱的乘积。这种乘积谱的一个较好的名称叫做效率光谱(由 F. Urbach 命名)。晒斑的效率光谱(图 3-6)在 308nm 附近有一个峰值(参阅 7.3.1), 这一点对搞阳光屏蔽的人来说是非常重要的。

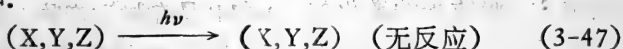
### 3.8 光敏化作用

在第 4 章里广泛讨论了光敏化, 特别是关于生物系统的

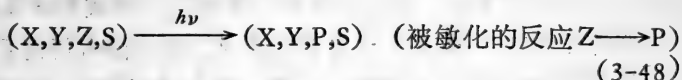
光敏化作用。这儿所作的简要论述可以算作为一个序言<sup>[13]</sup>。

被称作“光敏化作用”的现象是各种各样的。光敏化作用的一个定义是包罗所有情况的：一个系统中某一成分（光敏化剂）引起该系统的另一个成分与光反应的作用。这种反应在本章所感兴趣的情形下指的是化学反应。

一般说来，人们可以独立地研究某一不含敏化剂的系统，它在用特定波长的光照射时并不呈现所感兴趣的光化学变化。例如：



当存在敏化剂(S)时，就会发生光化学反应。例如：

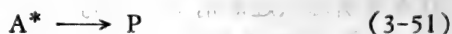


为了阐明光敏化作用的机制，人们必须测定：①敏化剂是否吸收激发光；②在反应中是否消耗了敏化剂；③在敏化作用中是否可能涉及到电子能量的传递；④在敏化作用中是否可能涉及到电子的传递；⑤分子氧是否是反应系统的一部分。对所有这些问题的回答是比较容易由实验得到的，当然得假定该系统的所有有关成分都是已知的。对一个光敏化反应来说，详细的分子机制可以从非常简单到极其复杂，而对以上所提五个问题的回答仅只构成比较粗略的分类。需要说明什么是敏化剂与该系统的关键的相互作用。该反应的作用光谱与敏化剂的吸收光谱（记住在 1.5.4 中所讨论的那些限制）的比较通常回答的是问题①。

光敏化剂的作用本质可能是催化作用，也就是说它迟早会回到它原来的形式并再起敏化的作用。实际上，大多数光化学家只把那些在反应中不消耗的敏化剂叫做敏化剂。然而，在光生物中的情况并非如此。

激发的传递也许给出敏化剂可以起作用而不被消耗的一

个最简单的作用模式。涉及激发传递的敏化作用的通常模式是：

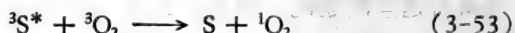


或：



其中  $S$  是吸收光的敏化剂， $A$  和  $B$  是在导致产物  $P$  或  $P'$  的光化学反应阶段中的反应物，而  $A$  是从  $S^*$  接受激发的适当的受体。在实际工作中，溶液光化学中最有用的模式都涉及到敏化剂的三线态。在没有敏化剂的情况下可能没有任何反应，这是因为要么反应物不吸收光，要么即使吸收的话，系间渡越到给出所感兴趣的反应的三线态的效率也只是很低的。

通过把激发能从一个适当的三线态敏化剂传递给基态的分子氧( $^3O_2$ )(三线态能量  $> 23$  kcal/mol, 此能量是激发基态氧到单线态所需要的)可以最有效地产生单线态氧( $^1O_2$ ):



$^3O_2$  和  $^1O_2$  之间的光学跃迁很弱，只有用激光强度才能直接激发产生足够浓度的  $^1O_2$ 。

对由光谱数据得到的电子能级的考虑经常是把激发传递的可能排除掉的充分依据。当能力学上是合理的时候，作为一种可能性必须考虑到激发的传递。

在敏化剂和系统的另一组分之间的电子传递是许多敏化光反应中的主要过程：

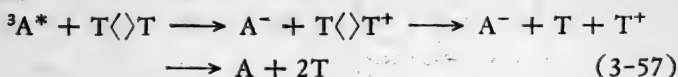
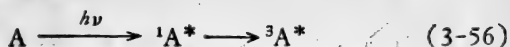


或：



由蒽醌磺酸( $A$ )通过电子传递机制在溶液中敏化胸腺嘧啶二

聚体(T⟨T)的光剪切如下:



根据基态的氧化还原电势并结合在传递中激发配偶(通常是敏化剂)的激发能量可以计算电子传递的能力学。如果在能力学上是不允许的话,通常就可以有把握地排除电子传递的考虑。但是,如果能力学上允许的话,也不是发生电子传递的充分条件。

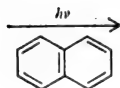
有许多这样的光敏化反应的例子,反应中看来在激发的敏化剂和底物之间形成了一种复合物(激发复合物)。这些反应是通过下述的观测来表征的:不消耗敏化剂,从能力学角度不允许激发的传递,底物发生的化学反应是单分子反应,即重排反应,而且看来不涉及任何个别的中间产物。底物-敏化剂相互作用的强度和性质看来变化很大。针对不同的情况把复合物写作(SA)\*, (S<sup>δ</sup>-A<sup>δ+</sup>)\*, (S<sup>σ</sup>+A<sup>δ-</sup>)\*, (S-A), 它们反应了从激发-共振相互作用到电荷-传递相互作用,最后到形成共价键的变化范围。

人们认为由芳香烃类(如萘)敏化的从降冰片二烯变为四烯烯的光异构化包含一个激发复合的中间产物(参阅 2.5.2), 电荷传递在这个中间产物里很重要[反应式(3-58)]。有人认为由酮敏化的烯类的光异构化可能涉及酮-烯共价键式的中间产物,这种敏化中酮的激发能不足以引起激发的传递。

在光生物学和医学中,光敏化作用的定义包括在所感兴趣的反应中消耗敏化剂的情况。通常情况下,敏化剂本不是系统的一部分,但当有意或无意地把它引入,就得到了光效应。消耗敏化剂的光敏化作用的最简单的情况是敏化剂成为光化学反应产物的一部分。例如,由呋喃香豆素类(Psoralen)



降冰片二烯



四环烯

(3-58)

光敏化的皮肤变色可能就包含着呋喃香豆素与表皮细胞 DNA 的光加成作用(参阅 4.4.1 和 7.6.2.1)。

如果敏化剂参加了产生一种催化剂的原初过程的话, 那它的消耗就可能是不明显的, 因为消耗少量的敏化剂就会导致大量产额的所感兴趣的反应。例如, 激发的敏化剂可以通过各种各样的途径反应而形成相当长寿命的自由基, 这些自由基可以引发一个长的自由基链反应过程, 如自氧化过程。

让我们用一个简单系统中光敏化的例子来结束这一节的讨论, 在这个例子里光敏化剂不吸收光。直接照射溶于乙醇的香豆素产生顺-顺光二聚体的量子产额很低。这种二聚体是由香豆素的单线态形成的。在苯溶液中则没有任何二聚体形成。把少量的二苯甲酮加入香豆素的苯或乙醇溶液, 就会以很高的量子产额产生香豆素的反-顺式二聚体, 即使全部的激发光都被香豆素吸收也是如此。反-顺式二聚体是由香豆素的三线态形成的, 而二苯甲酮的敏化效应包含着由两步能量传递形成香豆素三线态: 香豆素单线态把能量传递给二苯甲酮使其发生系间跃越, 然后二苯甲酮的三线态又将激发反传给香豆素。从这个例子我们知道, 即使鉴别了一个复杂系统的光化学产物和光吸收成分以后, 也有可能忽略了某一重要的控制或敏化成分。

### 3.9 小 结

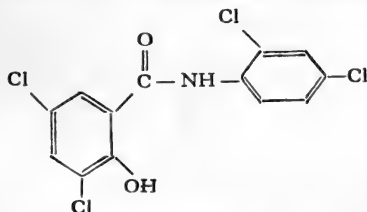
除了纯粹对光吸收的热效应的反应外, 光生物反应意味

着吸收的光影响了某些根本的化学变化。分子吸收一个光子就产生一个电子激发的分子。激发的分子在短时间内( $10^{-12}$  —  $10^{-3}$ s) 通过几种可能的途径弛豫(放出其多余的电子能量),在这些途径中有一些将导致化学上不同于起始分子的基态分子。光以这种方式影响的化学反应叫做光化学反应。

由于电子激发的分子的弛豫,最直接出现的化学变化叫做原初光化学过程。原初光化学过程的产物可以是稳定的化学产物。但是,大多数原初光化学过程的产物是具有高度活性的中间产物(如自由基、离子等),它们在继发的(热的)过程中进一步反应。光化学系统的微环境常常以不同的方式影响原初光化学反应和继发的化学反应。因此必须记住,在模式光生物系统中产生某些最终产物的总效率可能以很复杂的方式依赖于实验条件上的变化。在把光化学反应与光生物反应联系起来时我们必须谨慎从事。随着对原初光化学反应和继发的化学反应的机制的详尽了解,人们可以在基础的光化学水平上找到促进、改变或消除光生物学反应的方法。

### 3.10 练 习

(1) 抗菌药物卤化水杨酰替苯胺(例如四氯水杨酰替苯胺)能够引起滞后过敏性型的光变态性反应。过敏原大概是某些以光化学反应产生的由水杨酰替苯胺与载体蛋白结合而



四氯水杨酰替苯胺

组成的化合物。具有不同数目和类型(氯或溴)的卤素取代基的水杨酰替苯胺在实验动物身上导致不同严重程度的光变态性反应。尽你所能地写出从水杨酰替苯胺的局部应用开始的一系列步骤和对滞后的光变态性反应的观察。考察这些步骤中的哪些可能对水杨酰替苯胺的某种变化敏感。提出旨在解释由不同的水杨酰替苯胺引出不同反应的一项研究的总轮廓。(已有人提出但未证明: 关键的原初光化学过程是卤素从酚环上均裂劈开。)

(2) 用 313nm 的光照射去空气的苯溶液时, 2-甲氧基萘会发生光二聚体化。当把 0.05M 的二苯甲酮加入溶液时, 用 360nm 的光(只被二苯甲酮吸收)或是用 313nm 的光(即使在有二苯甲酮的情况下甲氧基萘也吸收此光的大部分)照射都无二聚体形成, 请解释之。(提示: 2-甲氧基萘的最低激发单线态和三线态的能量分别约为 95 和 60 kcal/mol, 对于二苯甲酮则分别为 85 和 70 kcal/mol。)

(郭绳武译 沈 恂校)



## 第4章 光敏化作用

John D. Spikes

(犹他大学生物系)

4.1	序言 .....	106
4.2	包含分子氧的光敏化反应机制 .....	107
4.2.1	敏化剂分子的激发态 .....	107
4.2.2	自由基的光氧化 .....	108
4.2.3	单线态氧的光氧化 .....	109
4.2.4	光动力敏化剂 .....	110
4.3	包含分子氧的生物光氧化(光动力作用) .....	114
4.3.1	醇类和碳水化合物 .....	114
4.3.2	脂肪酸和脂类 .....	114
4.3.3	氨基酸和蛋白质 .....	115
4.3.4	嘌呤、嘧啶和核酸 .....	116
4.3.5	病毒 .....	117
4.3.6	亚细胞水平 .....	119
4.3.7	细胞和单细胞生物 .....	120
4.3.8	多细胞植物 .....	122
4.3.9	多细胞动物 .....	122
4.3.10	“天生的”光敏感性 .....	125
4.3.11	光、光敏化剂和癌 .....	126
4.3.12	食物的光变质 .....	127
4.4	不包含分子氧的光敏化反应 .....	128
4.4.1	呋喃香豆素 .....	128
4.4.2	其他光敏化反应 .....	131

4.5 结论 .....	132
4.6 实验 .....	134

## 4.1 序 言

作为对光敏化专题的介绍在第3章的3.8已经给出了光敏化作用的概貌,本章的论述着重在生物系统的光敏化作用。大多数细胞对可见光的直接效应是不那么敏感的,因为它们的主要有机组分在此波长范围内没有明显吸收。但是,在有适当的光敏化剂存在时,有机体、细胞及许多类型的在生物上有重要意义的分子都可以受到可见光的损伤和破坏。细胞可能由于对某些细胞器的选择性光化学效应而被杀死;对细胞器的损伤是由于该细胞器内大分子的选择性变化造成的,而这些大分子的变化又是由于对它的某些亚单元的选择性损伤引起的。因此,在生物学中光敏化作用的研究范围极广,从敏化剂激发态分子的光化学研究直到哺乳动物的光敏化致死。

虽然我们现在知道人们必然很早就观察到了光敏化现象<sup>[1]</sup>,但我们通常还是认为光生物学的这一领域是从 Oscar Raab 的工作开始的,他当时是慕尼黑的医科学生。他曾证明吡啶敏化可见光杀死草履虫的事实,这一工作发表于1900年。这些年来在这一领域又做了大量的研究。除了作为一种光生物学现象它所具有的基本意义外,光敏化反应的研究在近年来显示出了较大的重要性,因为大量的各种各样的化学药物在医学、工业、农业及家庭中的应用迅速扩大,其中就有许多是敏化光对人的损害的。

在大多数光敏化反应中,涉及的光能是被敏化剂分子吸收的,而不是被受影响的生物系统所吸收。在敏化作用研究中一般是用波长大于320nm的光,因为生物学上重要的分子,

包括蛋白质、核酸,只在较短波长上有吸收。在生物学文献中常把光敏化剂称作“染料”,尽管许多光敏化剂实际上并非染料。要起到光敏化剂的作用,一个分子必须不仅能吸收所涉及的波长的光;而且正如在后面我们将会看到的那样,一般说来它必须能被光激发到一长寿命的高能形式,即三线态(参阅2.3.5)。许多种天然的和人工合成的分子可以充当光敏化剂。

人们研究过的大多数生物系统中的光敏化反应都有分子氧的参加,也就是说这些生物系统被光氧化过程所敏化。生物系统中的这种反应常被称做“光动力作用”或“光动力反应”<sup>[4, 6]</sup>。在这一类型的反应中,敏化剂往往并不消耗或破坏,而有点像催化剂那样被反复不断地使用。反之,有几种类型的敏化剂,例如呋喃香豆素,在它们的作用中不需要分子氧,同时在反应中可能有消耗。

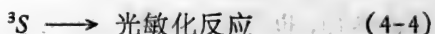
## 4.2 包含分子氧的光敏化反应机制<sup>[6-15]</sup>

多数光敏化反应都包含敏化剂分子的电子激发态。受激发的敏化剂可以直接与底物(在反应中被改变的分子)或者与反应混合物中的某种其他分子反应,给出的产物再与底物反应。许多敏化反应相当复杂,并涉及两个或多个反应途径的竞争。

### 4.2.1 敏化剂分子的激发态

正如在3.8节所讨论的,光动力反应涉及到敏化剂分子的电子激发态。在暗条件下,敏化剂分子处于所谓基态  $S_0$ , 由于吸收一个光子,敏化剂分子从基态跃迁到一个短寿命的( $10^{-9}$ — $10^{-6}$  s) 高能激发态,即激发单线态  $^1S$ 。最有效的光动力敏化剂会接着以很高的效率“渡越”到一个长寿命的

( $10^{-3}$ — $10$  s) 激发态, 即三线态  $^3S$ 。由于它的寿命较长, 三线态敏化剂在其衰变回到基态之前有很多机会与其他分子相互作用。因此, 一般说来, 光敏化的氧化作用都要经由敏化剂的三线态。这些反应大致表示如下:

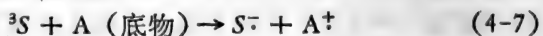


如我们所看到的,  $S_0$  吸收一个光子  $h\nu$ , 经由反应式(4-1)给出  ${}^1S$ ;  ${}^1S$  可以通过反应式(4-2)衰变回到基态, 或通过反应式(4-3)渡越而给出三线态  ${}^3S$ 。三线态敏化剂可以通过氢原子或电子传递过程(称作第 I 类 = 自由基 = 氧化还原反应)或者能量传递过程(称作第 II 类反应)与它周围的分子发生原初反应[反应式(4-4)]。在下面两节中将对这两种过程加以说明。三线态敏化剂可以按反应式(4-5)衰变回到基态; 也可以借助某些化合物(物理猝熄剂 Q)转变为基态, 如反应式(4-6)所示:



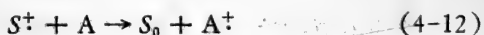
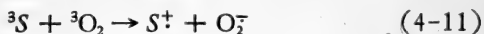
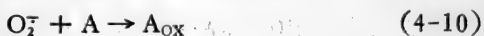
#### 4.2.2 自由基的光氧化

三线态敏化剂分子通过电子传递过程可以直接与某种底物分子 A 反应, 给出该敏化剂的一种半还原形式  $S^-$  和该底物的一种半氧化形式  $A^+$  [反应式(4-7)]; 后面这两种产物是自由基。半氧化的底物经由反应式(4-8)可以与分子氧反应, 给出一个全氧化的产物  $A_{ox}$ :



也可能有一些别的没有给出的反应<sup>[9]</sup>, 其中包括链式反应。由

半还原形式通过与氧的反应可以重新生成基态敏化剂 [反应式(4-9)]; 在这个过程中能够产生超氧化物自由基  $O_2^-$ , 并通过反应式(4-10)再氧化该系统中的另一种分子。通过三线态敏化剂和基态氧之间的电子传递也可以产生超氧化物; 这个反应的另一个产物是敏化剂的半氧化形式  $S^+$  [反应式(4-11)]; 这个过程一般来讲效率是相当低的, 由敏化剂的半氧化形式可以重新生成基态敏化剂, 如反应式(4-12)所示, 而超氧化物自由基可以氧化某些底物, 如反应式(4-10)所示:



通过第 I 类过程所进行的一个著名的简单反应是仲丙醇的光氧化。在原初光化学阶段, 三线态敏化剂把氢从醇的一OH 基团中抽提出来, 然后丙醇自由基生成丙酮, 而敏化剂自由基与氧反应, 最后给出基态敏化剂和过氧化氢。如果在有黄素存在的情况下照射蛋氨酸, 则三线态黄素从该氨基酸的硫原子上拉出一个电子; 所产生的蛋氨酸自由基发生脱氨基和脱羧基反应给出甲硫丙醛( $\beta$ -methylmercaptopropionaldehyde)。然后黄素自由基参与一系列的给出基态黄素和过氧化氢的反应。在这两个例子中, 基态染料再生, 而后可参加另一个底物分子的光氧化。某些光敏化剂, 包括蒽醌染料和酮类, 趋向于通过第 I 类过程进行敏化; 容易还原的化合物, 如胺和酚, 都是适宜第 I 类反应的底物。

### 4.2.3 单线态氧的光氧化

最常见的第 II 类过程(能量传递)是三线态敏化剂与基态氧(它也处于三线态)的相互作用。这一过程的主要途径表示

于反应式(4-13)，它给出基态敏化剂和高活性的单线态氧 $^1\text{O}_2$ ：



单线态氧可以以两种激发态存在；其中一个 $^1\Delta_g$ 具有较长的寿命，它显然是光动力反应中涉及到的主要的一种单线态氧。单线态氧比基态氧活泼得多，它可以与各种各样的底物作用而给出底物的全氧化形式[反应式(4-14)]。敏化剂如：吖啶、卟啉、黄嘌呤(曙红 Y、玫瑰红等)以及噻嗪(亚甲蓝、劳氏紫等)，能给出较高产额的单线态氧，从而通过这一途径敏化反应。

单线态氧的途径在光动力反应中是很普遍的。许多技术可以用来确定一个特定的敏化剂是不是经由单线态氧的机制进行光氧化的。例如，单线态氧的寿命在重水( $\text{D}_2\text{O}$ )中是 20 微秒左右，相比之下在普通水( $\text{H}_2\text{O}$ )中只有 2 微秒。因此，某一光动力反应，如酶的钝化，如果在  $\text{D}_2\text{O}$  中进行比在  $\text{H}_2\text{O}$  中进行时其速率增大，就可以充分证明光氧化作用是通过单线态氧作为媒介的。另一个技术是加入一种能高效猝灭单线态氧的化合物，例如叠氮钠，检查它对反应速率的影响，如果所考虑的反应的速率由于加入叠氮钠而急剧降低，那么这就是对单线态氧机制的很好的证据<sup>[16]</sup>。

必须着重指出，在敏化的光氧化中所包含的特定的反应途径有赖于敏化剂、底物及反应条件。在多数情况下，光氧化可以通过不只一个途径进行，因此，总的过程可能比前面反应式中所表示的要复杂得多。

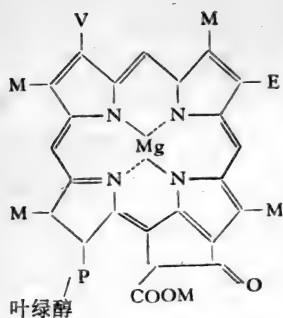
#### 4.2.4 光动力敏化剂

已经报道了很多种化合物能提高生物系统对光的敏感

性。在最新的汇编中列举了 400 种以上(参阅参考文献 7 第 11 页),而且必然还会有很多很多种。图 4-1 给出若干有代表性的光动力敏化剂的结构式;可以看到大多数是三杂环化合物。几乎所有的起光敏化作用的染料都是发荧光的,但是荧光本身并不涉及光敏化作用。重要的因素是染料三线态的寿命和形成三线态的效率。正如表 4-1 所示,对于胰蛋白酶的光动力钝化而言,荧光素衍生物的光动力效率正比于形成三线态的量子产额。

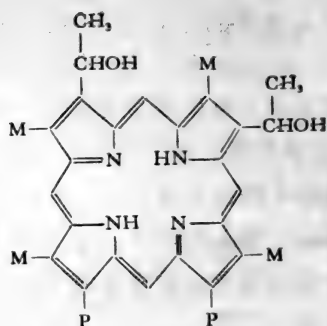
对诸如氨基酸和蛋白质那样的许多底物来说,自由染料就是有效的光敏化剂,但是对于核酸和病毒来说,为了有效的光氧化,染料往往必须与底物结合。在细胞和组织中,大多数有光敏化作用的染料可能是与细胞的特定结构结合或紧密连接在一起的。结合常常会改变光敏化剂的光动力效率,在一些极端情况下,一个好的敏化剂处于结合状态可能会丧失其全部活性,同时也存在一些这样的情况,某一化合物在溶液中是无活性的,而处在结合状态则变成光敏化剂。因此,在一个系统中致敏的染料在其他系统中并不总是有效的。

偶氮染料、靛酚、酮亚胺染料、甲川染料、硝基染料、亚硝基染料、噻唑染料、噻唑染料以及三芳基甲烷染料(参阅文献 17 中的结构)一般并不敏化像蛋白质这样的底物。对蛋白质起作用的光动力染料包括如下几类化合物的代表:吡啶(吡啶橙、二氨基吡啶等)、蒽醌、吡嗪(例如藏红素)、黄素(核黄素、黄素单核苷酸、光黄素,但黄素腺嘌呤二核苷酸不在此列)、卟啉(包括叶绿素及其某些衍生物、血卟啉、原卟啉等;但不包括含铁或其他顺磁金属原子的卟啉)、噻嗪(劳氏紫、亚甲蓝、甲苯胺蓝等)、硫代焦宁以及氧杂蒽(特别是荧光素,包括曙红 Y、玫瑰红等)。最近发现某些金属如钌的配位化合物是氨基酸和蛋白质的很好的光敏化剂。对于核酸来说,碱性染料如

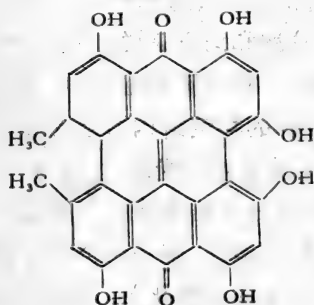


叶绿醇

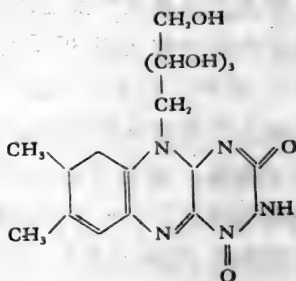
叶绿素 a



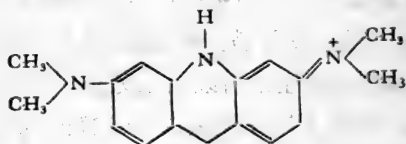
血卟啉



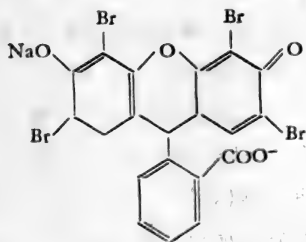
海棠素



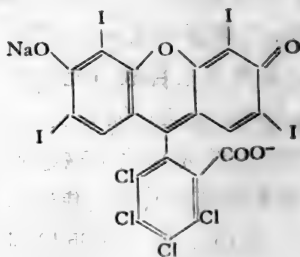
核黄素



吡啶橙

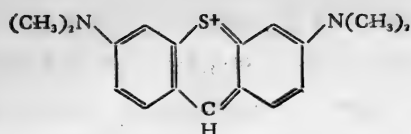


曙红 Y

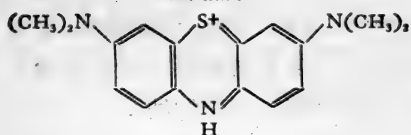


玫瑰红

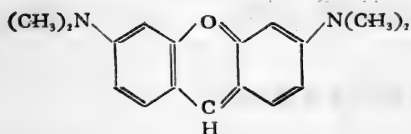




硫代焦宁



亚甲蓝



焦宁 Y

图 4-1 选出的一些光动力敏化剂的结构。叶绿素 a 和血卟啉是典型的卟啉类敏化剂；结构式中的 E, M, P, 及 V 分别代表乙基、甲基、丙酸及乙烯基。海藻素是一多环碳氢化合物。以荧光素作为基础的若干有效的敏化剂，包括曙红 Y (四溴荧光素) 和玫瑰红 (四氯四碘荧光素)。虽然在此列举的最后三种敏化剂具有很相似的结构，但它们在敏化能力上却有很大差别，其中硫代焦宁最有效，亚甲蓝很低，而焦宁 Y 几乎没有活性。

表 4-1 有取代基的荧光素敏化剂的光动力效率

敏 化 剂	量 子 产 额 <sup>a</sup>		
	$\phi_F$	$\phi_T$	$\phi_{PDA}$
荧 光 素 (荧光素钠)	0.92	0.05	0.00017
四溴荧光素 (曙红 Y)	0.19	0.71	0.0021
四碘荧光素 (赤藓红 B)	0.02	1.07	0.003

a.  $\phi_F$  是荧光发射的量子产额； $\phi_T$  是产生三线态的量子产额； $\phi_{PDA}$  是对胰蛋白酶的光动力钝化的量子产额。转引自 M. J. Wade 和 J. D. Spikes, *Photochem. Photobiol.* **14**, 221—274 (1971)。

亚甲蓝和硫代焦宁常常是最有效的光敏化剂；黄素和吖啶也相当有效。在细胞里，致敏染料必须能渗入细胞结构的敏感区才是有效的，即使对这种渗透能力作了校正，不同敏化剂的光动力效率也是变化很大的。例如，在有硫代焦宁存在的情况下光照大肠杆菌，大肠杆菌迅速被杀死，但是用亚甲蓝时杀死的就慢，而用焦宁 Y 就很慢很慢（参阅参考文献 7 第 107 页），尽管这三种染料有很相似的结构（参阅图 4-1）。

### 4.3 包含分子氧的生物光氧化(光动力作用)

#### 4.3.1 醇类和碳水化合物<sup>[9,18]</sup>

人们以醇作为一种模式化合物研究了碳水化合物的敏化的光氧化。在光照时，蒽醌和酮类敏化剂从醇的  $\alpha$ - 碳上夺走一个氢原子，给出醇的一个自由基形式；对伯醇来说这种自由基与分子氧反应生成醛或羧酸，而在仲醇的情况则生成酮。己糖醇在有这些敏化剂时的光氧化给出相应的己糖，并慢慢地给出相应的己糖酸<sup>[18]</sup>。由于多糖纤维素在纺织工业中的重要性，因而用它进行了大量关于碳水化合物的敏化的光氧化的研究。从机制上看，像在醇类的情况一样，纤维素的光氧化也是经由夺氢途径进行的；而纤维素不会被单线态氧大量氧化<sup>[18,19]</sup>。在有分子氧和若干不同敏化剂存在的情况下光照时，动物粘多糖透明质酸可被解聚，看来是通过自由基机制进行的<sup>[18]</sup>。

#### 4.3.2 脂肪酸和脂类

人们用各种敏化剂使未饱和的脂肪酸光氧化，用原卟啉 IX(一种单线态氧敏化剂)使硬脂酸甲酯、油酸、亚油酸及花生四烯酸发生光氧化。光氧化的速率常数从硬脂酸到花生四烯

酸酯以正比于每一个分子中双键的数目的方式增加<sup>[20]</sup>。在某些情况下,细胞水平上的光动力损伤可能涉及到膜脂和磷脂中脂肪酸链的光氧化。

### 4.3.3 氨基酸和蛋白质<sup>[6,21,22]</sup>

在发现光动力作用之后不久,就证明了在有曙红存在的条件下光照使粗制的淀粉酶、蔗糖酶及木瓜蛋白酶钝化。近年来对氨基酸、寡肽及各种蛋白质的光动力效应的机制进行了大量的研究。已经研究过的有 100 种以上的纯化的蛋白质<sup>[6]</sup>。

在有代表性的蛋白质中存在约 20 种不同的氨基酸,其中只有五种一般能够接受敏化的光氧化,它们是半胱氨酸、组氨酸、蛋氨酸、色氨酸和酪氨酸。自由氨基酸的光氧化速率取决于致敏染料、溶剂、pH 及包括氧在内的反应物的浓度。通过改变染料和反应条件,可以选择性地光氧化一些氨基酸,例如组氨酸只在 pH6 以上才光氧化,这时咪唑环上的氮是离子化的,酪氨酸光氧化最迅速是在 pH10 以上,这时酚基是离子化的<sup>[21]</sup>。在大多数情况下人们对氨基酸光氧化的有机化学(原初产物、中间产物、最终产物)了解得很差。用亚甲蓝、前黄素及玫瑰红时,蛋氨酸光氧化的最终产物是蛋氨酸亚砷;其中包含单线态氧机制。相反,用黄素敏化剂时,主要的终产物是甲硫氨醇,这种情况下涉及到夺电子机制<sup>[21]</sup>。用亚甲蓝时,色氨酸给出两类光氧化产物,它们是犬尿素和黑素类。用结晶紫时半胱氨酸被光氧化为磺基丙氨酸。组氨酸和酪氨酸在光氧化时产生很多种产物<sup>[21]</sup>。

基本上所有的蛋白质都容易光氧化。在有光敏化剂存在的情况下光照蛋白质,氧被消耗而氨基酸残基被破坏。蛋白质内的二硫键和肽键一般不会因光氧化而断裂;其化学变化涉及五种敏感氨基酸的侧链<sup>[21]</sup>。正如在自由氨基酸的情况一

样,蛋白质的光氧化速率取决于敏化剂和反应条件。一般来讲,如果蛋白质中某一氨基酸残基能被迅速光氧化,那就说明它们是“暴露”于蛋白质分子的表面。其他的残基破坏很慢或完全不受破坏,说明由于它们被“埋”在蛋白质的三维结构内而受到不同程度的保护<sup>[21]</sup>。在光氧化时蛋白质内发生着若干物理化学变化,它们包括在紫外线吸收、扩散和沉降特性、受蛋白酶的消化能力、电泳迁移率、热敏感性、光散射特性、旋光、溶解度、表面张力、粘度、机械特性等方面的变化<sup>[6]</sup>。

光动力反应一般来讲改变了蛋白质的生物学特性。研究最多的一种改变是光氧化时酶的催化活性的进行性丧失,钝化的量子产额在 0.001 量级,大大小于对于自由氨基酸的产额。钝化可以通过两种机制产生:一种是直接的,即破坏分子活性部位的氨基酸残基,一种是间接的,即破坏为酶的活性构象所必需的那些残基。同样,钝化机制取决于敏化剂和反应条件。光氧化还可以在蛋白质中引起其他类型的生物学变化,包括蛋白质激素例如胰岛素的活性丧失;抗原特性和抗体反应活性上的变化,蛇的毒液和细菌毒素的毒性丧失等等<sup>[6]</sup>。

#### 4.3.4 嘌呤、嘧啶和核酸<sup>[6,7,23]</sup>

用大多数致敏染料对自由碱基、核苷及核苷酸的研究都表明,鸟嘌呤及其衍生物在  $\text{pH} \sim 8$  的条件下光氧化最迅速,胸腺嘧啶衍生物就缓慢多了,而腺嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶的衍生物则基本上不受影响。在更高的  $\text{pH}$  值下,鸟嘌呤分子的 1-N 原子上解离出一个质子,使它对光氧化的敏感性迅速增加;这说明鸟嘌呤阴离子比中性分子敏感得多<sup>[7,23]</sup>。对嘌呤和嘧啶敏化的光氧化化学人们了解的不多。在光氧化时鸟嘌呤及其衍生物的环都被破坏;产物研究表明形成了胍、乙二酰脲、 $\text{CO}_2$  及一系列尚未鉴别出的产物<sup>[6,7,21]</sup>。对由敏化的光氧

化得到的产物与由单线态氧氧化得到的产物(所用单线态氧是以化学方法和射频放电产生的)加以比较说明,在鸟苷及其有关化合物的敏化的光氧化中涉及到单线态氧和自由基这两种机制<sup>[24]</sup>。与大多数敏化剂的结果相反,黄素敏化腺嘌呤及其核苷酸的快速光氧化<sup>[25]</sup>。

在有各种各样的染料存在的情况下光照时,在离体和在线细胞内的DNA上都是鸟嘌呤残基被选择性地破坏。虽然染料与底物的结合并不是很多光动力过程所必需的,但看来敏化剂与核酸的结合常可增加光动力作用的效率<sup>[23]</sup>。光氧化导致DNA特性上的一系列变化,包括溶解温度降低、粘度降低(由于链断裂所致)以及容易被酶降解<sup>[6,7]</sup>。这样的化学变化改变了核酸的生物活性。例如,烟草花叶病毒RNA的感染能力以及细菌DNA转化原理里的转化能力被破坏<sup>[6]</sup>;正如后边将要讨论的,光动力处理将在病毒和细胞内产生突变。最后,光动力处理还会降低从细菌提取DNA的能力;这是由于DNA与蛋白质的光化学交联造成的,这样的交联也会在离体条件下出现<sup>[26]</sup>。

#### 4.3.5 病毒<sup>[6,23,27,28]</sup>

在光动力研究中所使用的第一类病毒是噬菌体。致敏染料渗入噬菌体内是决定光动力作用敏感性的一个重要因素。例如奇T因子大肠杆菌噬菌体对光动力处理很敏感,而偶T因子大肠杆菌噬菌体则是抗性的;这一差别是由于染料透过偶T因子噬菌体的蛋白质头膜速率很慢所造成的(参阅参考文献7第297页)。噬菌体的光动力处理可以损伤核酸和蛋白质,核酸的损伤是更为重要的因素;正如在自由核酸情况那样,光动力处理时首先是破坏完好噬菌体DNA内的鸟嘌呤残基。在强烈的光动力处理之后观察到在多聚核苷酸链上的许

多断裂,以及 DNA 片断与噬菌体蛋白质外壳的交联<sup>[29]</sup>。用光动力处理过的噬菌体在具有重组和切除修复能力的宿主细胞内可以被暗复活;但是,没有观察到光动力钝化的噬菌体的光复活<sup>[30]</sup>。

在离体条件下通过光动力处理可以使若干动物病毒(腺病毒、狂犬病毒、牛痘病毒等等)失活<sup>[27]</sup>。某些病毒,例如脊髓灰质炎病毒是不敏感的,这显然是由于染料不能渗入病毒颗粒的缘故;而如果脊髓灰质炎病毒生长在有染料存在的黑暗条件下的细胞中,染料就能渗入病毒的结构中去,在照射时这样的病毒会很快被钝化<sup>[27]</sup>。如果在高 pH 条件下加入染料对病毒进行培养,许多抗性的动物病毒将会变得对光敏感;这样的处理大概是增加了病毒蛋白质外壳对致敏染料的渗透性<sup>[27]</sup>。光动力钝化的病毒常可以保持它们特异的抗原特性,因而可以用来制备治疗病毒感染的抗体<sup>[6]</sup>。通过光动力处理可以消除某些植物病毒(烟草花叶病毒、苜蓿花叶病毒等等)的感染能力<sup>[6]</sup>。

1931 年 Herzberg 曾报道用亚甲蓝的光动力治疗来抑制兔皮肤上的牛痘病毒斑疹<sup>[4]</sup>。最近,对人的皮肤和生殖器单纯疱疹感染采用了光动力治疗<sup>[31]</sup>。人们对一些病毒性病害使用了一些染料溶液,如中性红液,然后用像普通荧光灯那样的光源照射病毒性病害的区域。对这些治疗的疗效目前仍有争论。此外,人们对这种治疗可能带来的副作用有所担心,例如光动力治疗可能诱发肿瘤(参阅 4.3.11)。

从上述对核酸的效应可以预期,光动力处理将引起病毒的突变(参阅参考文献 7 第 280 页)。在有各种光敏化剂存在的情况下光照几种不同的噬菌体,观察到各种类型的突变<sup>[6]</sup>。通过对完好病毒及对分离出的病毒 RNA 的光动力处理也产生了烟草花叶病毒的一些突变型;有些突变型病毒在蛋白质

外壳中出现氨基酸变化<sup>[6]</sup>。用前黄素进行光动力处理也在一种动物病毒——脊髓灰质炎病毒里诱发出一些突变株(参阅参考文献7第280页)。我们推测,突变是由于病毒核酸中的鸟嘌呤残基的光氧化造成的;但是不要忘记,光动力处理可以产生核酸自由基、核酸与蛋白质的交联以及各种高反应活性的产物<sup>6</sup>,例如过氧化物,它们都可能引起核酸的化学变化,从而产生突变。

#### 4.3.6 亚细胞水平<sup>[3,4]</sup>

对光动力处理而使细胞损伤和死亡的机制还了解的不多。由于不同的染料具有不同的分子特性而可能分布在某些细胞器或细胞器的某些特定部分,因此可以预料到它们的选择性效应。例如,用荧光显微镜已经证明,在有卟啉存在时培养的各种类型的哺乳动物细胞中,敏化剂浓集于溶酶体。随后的光照使溶酶体膜的通透性增加,并导致溶酶体破裂,然后细胞便死亡,这可能是由于溶酶体的水解酶释放到细胞质里所造成的<sup>[32]</sup>。某些敏化剂,例如玫瑰红,看来是选择性地累积在细胞的质膜中;光照时,被敏化的细胞在通透性上发生改变而使钾离子丢失,并随后发生原生质外流<sup>[32]</sup>。吖啶橙选择性地累积在染色体中,光照有氧存在的吖啶处理的植物细胞会产生染色体断裂<sup>[4]</sup>。

还可以用分离的细胞之一部分研究在亚细胞水平上光动力处理的效应。例如,在有氧和曙红存在的情况下光照分离出的肝溶酶体,使大量的 $\beta$ -甘油磷酸酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶释放出来<sup>[33]</sup>。分离出的大肠杆菌核糖体在光动力处理后丧失其使氨基酸参入多肽的能力<sup>[34]</sup>。对分离出的哺乳动物细胞腺粒体的光动力研究指出,氧化磷酸化的某个阶段比呼吸链更为敏感。虽然腺粒体的琥珀酸脱氢酶比细胞色素

氧化酶敏感得多(参阅参考文献 7 第 464 页),但尚未确定光动力作用对电子流的干扰部位。在 4.5 中还要进一步讨论亚细胞水平上的光动力研究。

#### 4.3.7 细胞和单细胞生物<sup>[4,8,23,35,36]</sup>

人们用许多不同的敏化剂和各种类型的细胞研究了对细胞的光动力效应,这些细胞包括微生物(原核的和真核的都有)和取自多细胞生物的细胞。已经对许多种细胞反应作了描述,这些反应取决于细胞的类型和状态,也和敏化剂以及反应条件有关。在某些情况下,敏化剂在黑暗条件下是毒性的;因此总要做适当的对照实验以检验这一可能性。在有分子氧存在的情况下加光敏化剂进行光照,大多数种类的细菌被迅速钝化(用照后形成菌落的方法)。光动力处理可以拟制细菌的糖酵解、呼吸及蛋白质合成;还可改变膜的特性<sup>[37]</sup>。其膜结合有类胡萝卜素的滕黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)的野生型细胞,对用敏化剂甲苯胺蓝的光动力致死比无类胡萝卜素的突变种敏感性低<sup>[36]</sup>。在细菌的光动力钝化动力学研究方面,“一次击中”和“多次击中”两种钝化曲线都观察到了<sup>[4,3]</sup>(参阅图 4-2)。某些菌株的细菌在加吡啶橙或吡啶黄进行光动力处理之后表现出暗恢复,而别的一些菌株则没有暗恢复<sup>[38]</sup>。

虽然单细胞绿藻在光动力研究中用得不多,但它们对光动力处理很敏感<sup>[4]</sup>。然而,原生动物,特别是草履虫却被广泛应用于光动力研究之中,其效应取决于所用的原生动物、敏化染料及反应条件。其反应包括细胞分裂的延迟、能动性的丧失、对随后的热处理敏感、伸缩胞的钝化和溶胞<sup>[4]</sup>。

用取自多细胞生物的“自由”细胞进行了许多研究。例如,自从 1908 年证明在有血卟啉或叶绿素制剂存在下光照兔的红血细胞引起其溶血以来<sup>[8]</sup>,哺乳动物红血球就被广泛用



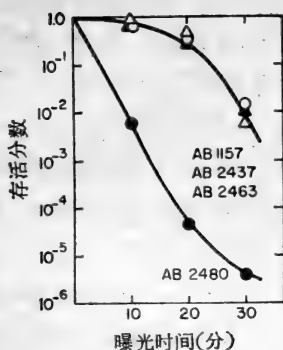


图 4-2 四种不同菌株的 K12 大肠杆菌的光动力致死与光照时间的函数关系。光敏化剂是浓度  $10\mu\text{g/ml}$  的吖啶黄。AB 1157 菌株是“野生型”，AB 2437 ( $uvr^-$ ) 和 AB 2463 ( $rec^-$ ) 菌株是单突变型，AB 2480 菌株 ( $uvr^-rec^-$ ) 具有一个双突变，这个双突变影响着对紫外线的敏感性(引自参考文献31,并重新绘制)。

于光动力实验，红血球的光动力损伤似乎是一种纯粹的膜的现象。光动力溶血的效率是低的；一个受敏化的细胞必须吸收约  $10^{10}$  个光子才会导致溶胞。含有某种卟啉的人的红血球(在某些生理状态下,体内积累了一些异常的卟啉)是光敏的。例如，从患有生血性原卟啉紫质沉着症的患者身上取出的细胞在有氧情况的离体光照时迅速溶血；这样的细胞含有自由的原卟啉，而它正是一种已知的光动力敏化剂<sup>[8]</sup>。光照时细胞膜中的氨基酸被破坏,同时从细胞中释放出钾,这说明膜受到损伤;膜的酶系,例如乙酰胆碱酯酶也被钝化<sup>[8]</sup>。最近的研究提出，存在于红细胞膜中的胆固醇的光氧化产物增加了膜的渗透脆性,从而导致溶血<sup>[39]</sup>。一些还原剂和某些别的化合物使取自原卟啉紫质沉着症患者的细胞的光敏感性降低； $\beta$ -胡萝卜素(敏化剂三线态、单线态氧的猝熄剂)特别有效<sup>[8]</sup>。在

光动力研究中还广泛采用了从植物和动物组织中分离出来的细胞, 以及维持在组织培养条件下的细胞<sup>[4,8]</sup>。例如, 骨骼肌纤维和神经细胞在有致敏染料存在情况下光照时会去极化<sup>[4,40]</sup>。组织培养的人和动物细胞的光动力处理将会引起: 死亡、蛋白质合成的停止、干扰 DNA 的复制和有丝分裂、蛋白质和核酸的破坏、维持病毒生长能力的丧失等等<sup>[4,8]</sup>。

最后, 光动力处理在微生物中可产生突变; 光动力致突的效率取决于所使用的敏化剂和微生物品系 (参阅参考文献 7 第 280 页)。在脉孢菌、酵母和各种细菌中都会产生突变<sup>[4]</sup>。最新的研究证明, 在用亚甲蓝和镇定剂氯普吗嗪作为敏化剂时, 光动力作用使鼠伤寒沙门氏菌中产生碱基对取代突变和移码突变两种突变<sup>[41]</sup>。

#### 4.3.8 多细胞植物<sup>[1,4,36]</sup>

在对多细胞植物的光动力效应方面进行的研究不多。但是一般地说, 在有敏化剂存在的情况下光照会损伤或杀死植物的根、茎、叶等组织, 而在这些反应中必须有氧参加<sup>[1,4]</sup>。即使不加敏化剂, 只要有氧而无二氧化碳, 很高强度的光照也会使叶子漂白和致死; 这是由于被内源叶绿素敏化的光氧化过程所致<sup>[4,36]</sup>。在正常状态下, 由于存在高浓度的类胡萝卜素而使叶绿体组分不被光氧化<sup>[4,36]</sup>。如果让光敏感性高的植物 (如小麦) 的根吸收致敏染料, 然后单侧照光, 于是由于照光一侧的生长受到抑制而使它们向光源方向弯曲<sup>[1]</sup>。

#### 4.3.9 多细胞动物<sup>[1,2,4,8]</sup>

##### 4.3.9.1 哺乳动物

在哺乳动物的敏化中存在两种对光反应的机制, 即光毒性机制和光变态机制, 这要看所用的光敏化剂<sup>[42]</sup>。光毒性反

应是即刻发生的,而且如果使用足够的敏化剂和光,就会在所有的动物身上出现。光变态反应是滞后的,它似乎是由于光敏化所形成的新的化合物所致,这些化合物与蛋白质作用而产生一些“光致抗原”,然后这些光致抗原产生某种免疫型的反应<sup>[42]</sup>。光毒性反应包含着一系列特征性的光照症状,包括活动性过度、皮肤搔痒和皮肤损伤(包括变红、水肿、坏死及溃烂)<sup>[4]</sup>。除了局部反应外,在严重的光敏化作用之中还会出现肠出血、血压降低和血液循环性虚脱;这些反应多半是由于在皮肤中由光动力作用形成的毒性化合物经血液而广泛转移的结果<sup>[4]</sup>。

上个世纪观察到在尿中伴有异常卟啉排泄物的人的光敏感性<sup>[8]</sup>。1931年 Meyer-Betz 第一次用实验的方法证明人的光敏化作用,他是一个医生,他给自己注射血卟啉,然后有控制地对其身体的一些部分作光照;每次光照都引起红斑、肿胀、并继之以色素沉着<sup>[8]</sup>,这种光敏感性可以保持两个月。人体的光敏化可由摄取敏化剂、皮肤接触敏化剂、注射光敏化药物或某些病态造成,这些病态包括药物引起的和遗传的卟啉症(是一种与异常的卟啉代谢有关的病态)<sup>[43]</sup>、红斑狼疮及糙皮病<sup>[42]</sup>。药物引起的卟啉症患者从皮肤缓慢地排出大量的尿卟啉(一种光敏化剂);他们表现出显著的光敏感性。在遗传生血性原卟啉症的情况下,异乎寻常数量的另一种敏化剂-原卟啉累积于体内;具有这种病症的某些人则表现出中等程度的光敏感性(参阅参考文献 7 第 464 页)。口服作为光防护剂的 $\beta$ -胡萝卜素显著降低许多有生血性原卟啉症患者的光敏感性<sup>[44]</sup>。由于医疗实践中使用的许多药物都能起光敏化作用,包括某些麻醉剂、抗生素、抗组胺、消毒剂、巴比妥酸盐、利尿剂、口服抗糖尿病剂、呋喃香豆素、黄胺、防日光药及镇静剂(特别是吩噻衍生物,如冬眠灵)<sup>[42]</sup>,常常把由化学药物引起的

人体的光敏感性叫作“药物光敏感性”。此外，农业、工业、家庭等常用的多种化学药品也是光毒性的。医疗实践中所用的药物一般都用实验动物如豚鼠和无毛小鼠从光敏作用角度做过筛选。化妆品也需要仔细地筛选。在第7章就会看到关于人的光敏化反应更详细的资料。

在世界的许多地方生长着大量含有高效光动力敏化剂的植物；吃这些植物的动物可以变得极其光敏感<sup>[1,2]</sup>。这些动物表现出类似于上述对人体的那些情况的反应；在严重情况下它们就会死亡。在皮肤无色素沉着的区域敏感性最高；由于这一原因，在世界的某些地区历来不能饲养白马和白羊，世界范围内都有的海棠属植物就属于这种最坏的有害植物。这一属的许多种植物都含有一种高效的光动力敏化剂——金丝桃蒽酮（或其衍生的化合物）<sup>[1,2]</sup>；图4-1给出了它（海棠素）的结构。另一种属的植物——荞麦属（荞麦）也使吃它们的动物（猪和鸡）产生对光敏感的色素。由于它们的光敏化能力，再不能用荞麦叶作为饲料（种子含有很少的光敏化剂，因此吃荞麦饼是没有危险的）<sup>[1]</sup>。

反刍动物有时表现出一种由于其肝功能的紊乱引起的光敏感性<sup>[1,2]</sup>。这种敏感性是由于叶红素——一种叶绿素的衍生物的累积造成的，叶红素通常是在胆汁中排泄出去的<sup>[1,2]</sup>。如果反复喂食少量的四氯化碳（它引起肝损伤）或结扎总胆管，豚鼠就会变为光敏感的<sup>[4,5]</sup>。在这两种情况下，光敏化似乎是由于叶红素累积的结果；在第一种情况下大概是由于肝损伤而不能正常地排出这种物质的结果，在第二种情况则是由于胆管的机械阻塞的结果。如果喂食绿色植物，结扎羊的胆管也可以导致光动力死亡；但是吃不含叶绿素食物的羊则不出现光动力死亡。有时在牛身上也观察到遗传型的卟啉症<sup>[1,2]</sup>，完全按照孟德尔方式遗传的这种病状的牛，在尿、牙齿和骨

酪里出现淡红色的色素沉着；色素浅的皮肤区域对光高度敏感。用通常的实验室动物如兔、大鼠及小鼠已经做了大量光敏化方面的工作<sup>[8]</sup>。由于必须有氧存在（在业已研究过的那些情况下），所以在小哺乳动物身上的卟啉敏化的光毒性是一种真正的光动力型敏化。

#### 4.3.9.2 其他动物<sup>[1,4]</sup>

对低等脊椎动物和无脊椎动物的光敏化反应研究的相当少。Blum 曾描述过关于两栖类、鱼、轮虫类及水螅的早期工作<sup>[4]</sup>。最近，发表了一些关于蝶螈、两栖动物幼体及昆虫的光动力研究的工作<sup>[4]</sup>。许多染料可敏化由阳光杀死蚊子幼虫<sup>[4]</sup>；其中某些染料在对小鱼没有影响的浓度下也是有效的，说明这有可能是一种控制蚊子的技术。家蝇成虫在摄取染料如玫瑰红、若丹明及四碘荧光素 B 之后，用光照射就可以把它们杀死<sup>[46]</sup>。虽未弄清其杀死机制；但是，敏化的昆虫在照光时的行为说明与神经系统有关。这一工作使人联想到掺入适当诱饵的光动力染料可以用来作为控制正趋光性昆虫的杀虫剂。虽然仅研究过几种动物，但还是有理由认为，任何动物都可以通过适当的方式引入染料来提高对光的敏感性。

#### 4.3.10 “天生的”光敏感性<sup>[3,4,47-49]</sup>

某些多细胞动物可以被可见光损伤和杀死；这是内源色素光敏化的结果。实验证明在某些情况下是需要氧的。例如，如果在有氧条件下用强光照射，几分钟内就可把小的水生环节颤蚓属的腔肠动物(*Tubifex*)杀死；这种生物正常情况下生活在水中氧含量和光强度都很低的区域<sup>[50]</sup>。此外，某些多细胞动物的一些种类的细胞是光敏感的，特别是在有氧情况下波长短于 500nm 的强光使哺乳动物的视网膜受到严重

损伤<sup>[3]</sup>。在有氧条件下光照时吉田氏肝癌细胞的代谢明显降低,但在氮气条件下则不然<sup>[3]</sup>。在某些条件下,多细胞绿色植物在叶绿素调节的反应中还可受到光损伤<sup>[49]</sup>。

在很多种微生物中观察到天然的光敏感性。例如,可见光有选择性的钝化大肠杆菌的某些膜的主动输运系统<sup>[51]</sup>;这个现象在鉴别膜的能量耦联和传递过程涉及的组分分子上可能是很有用的。总的说来,人们还不知道天生光敏感性中所涉及的内源敏化剂的化学性质。赭虫属原生动物(*Blepharisma*)是一个例外;其细胞含有一种称作动物紫红素的红色荧光色素;这种色素在化学上类似于金丝桃蒽酮(图 4-1)并证明是一种光动力敏化剂<sup>[47]</sup>。在有氧条件下光照缺少有色的类胡萝卜素的光合细菌突变株,这种细菌很快被杀死;这个反应的作用光谱基本上与细菌叶绿素的吸收光谱相同,这表明叶绿素是一种光敏化剂<sup>[47]</sup>。光抑制了“无色”藻类(*Prototheca zopfii*)的呼吸和生长;对这个抑制效应氧是必需的<sup>[49]</sup>,这个现象的作用光谱说明有血红蛋白参加,而进一步的研究证明蓝光很快地钝化了细胞色素  $a_3$ ,它是呼吸电子传递链的一个组分<sup>[49]</sup>。可见光和 365nm 的近紫外光在细菌和某些其他微生物中诱发突变<sup>[48]</sup>,这其中大概涉及到某些起敏化剂作用的天然的、内含的发色团,这类可能的发色团(已知其中大多数存在于细菌之中)包括细胞色素、细胞色素氧化酶、黄素、血红蛋白、NAD、NADH、卟啉和醌。正如已经指出的<sup>[48]</sup>,这些积累的一系列对近紫外光和可见光天生敏感的例子,应当引起对在工业和家庭照明中日益增加的近紫外发光源和高强度可见光源的应用的关注。

#### 4.3.11 光、光敏化剂和癌<sup>[1,3,8,9,14]</sup>

众所周知,280—320 nm 范围的紫外线可以在实验动物

(并可能在人身上)中引起皮肤癌;但人们还不大知道在用适当的光敏化剂时,长波紫外线和可见光也可以引起皮肤癌。这是 Büngeler 在 1937 年首先证明的,他发现全身性光照皮下注射过曙红或血卟啉的小鼠产生了皮肤肿瘤:只用光照和只给敏化剂都无此效应<sup>[3]</sup>。估计在人身上也会出现这同样的现象;事实上,已有人认为大家知道的随着衰老在人的皮肤中累积的卟啉可能引起光动力致癌<sup>[3]</sup>。当用长波紫外线照射时,许多致癌的多环碳氢化合物,如 3,4- 苯并芘都是光动力敏化剂。用大量这样的化合物进行的研究表明,在化学致癌性和光敏化效率之间存在着很好的相关性<sup>[3]</sup>。用长波紫外线照射加速了用 3,4- 苯并芘溶液涂抹过的小鼠皮肤肿瘤的出现(参阅参考文献 7 第 671 页)。虽然用 3,4- 苯并芘作为敏化剂进行的光动力处理增加了植物细胞染色体断裂的频率,但还不清楚这类敏化剂的光动力致癌机制(参阅参考文献 7 第 671 页)。最近,关于光动力致癌的推测认为可能涉及到以光化学方式产生的单线态氧<sup>[9,25]</sup>。

1904 年 Jesionek 和 von Tappeiner 曾报道用光动力技术成功的治疗了人的皮肤肿瘤,他们的办法是用曙红液反复涂抹和注射到肿瘤区域,随后用阳光或弧光灯照射<sup>[1]</sup>。近来,人们用选择性更好的光化疗技术治疗实验动物的肿瘤,把血卟啉和它的某些衍生物吃进去,它们就浓集在肿瘤组织里;这样的累积就可以期望在光照时有选择性地敏化肿瘤细胞的光动力致死。采用这一技术,就可以高效率地杀死生长在小鼠和大鼠身上的各种各样类型的肿瘤<sup>[53,54]</sup>。

#### 4.3.12 食物的光变质

食物的光变质是为大家所熟知的现象,这也就是为什么对许多种光敏感食品要仔细储存和包装以防光照的原因。虽

然总的来讲还不知道食物光变质的机制,但某些情况显然是光动力过程。例如,橄榄油在有空气情况下受到光照常常会很快变质。这是由于油中未饱和脂肪酸侧链光氧化的结果,这个光氧化过程或许是通过油中含有的痕量叶绿素来敏化的;豆油也有类似的情况,豆油光氧化看来是通过单线态氧的机制进行的<sup>[55]</sup>。牛奶受到光照造成了核黄素敏化的牛奶蛋白质的光氧化变质<sup>[56]</sup>;除此之外,蛋氨酸被光氧化为甲二磺醛,它使牛奶产生一种特殊的怪味。在受到光照的啤酒中也产生一种类似的“阳光味道”;这就是通常都用暗棕色玻璃制作啤酒瓶的一个原因。贮存于透明器具里的土豆丝和其他快餐食品在光照时也会产生怪味;在某些情况下已经证明这是由于所用的烹调油光氧化的结果<sup>[57]</sup>。现在人们正试图用在这样的食品中加入类胡萝卜素的办法来防止这样的光化学变质。通常要考虑到的是,天然存在的光敏化剂是造成食物光变质的原因;但是新近的工作证明,某些人为的食物颜色也和光变质有关<sup>[58]</sup>。在摘下的叶子内的脂肪酸光照时发生光氧化,大概是由叶绿素来敏化的;变质最快的是亚油酸<sup>[59]</sup>。在阳光下干燥过程中,在干草中继续进行着敏化的光化学过程,这会降低它的营养价值;因此,把新鲜的绿色植物秸秆作为青贮饲料储存可以防止其营养价值降低。

#### 4.4 不包含分子氧的光敏化反应<sup>[47,60]</sup>

虽然本章重点放在需氧的光敏化反应,但是生物系统中的若干重要的光敏化过程并不需要分子氧,而且事实上由于氧的存在还会使它们受到抑制。

##### 4.4.1 呋喃香豆素

对某些生物系统来说,当用长波紫外光照射时若干呋喃



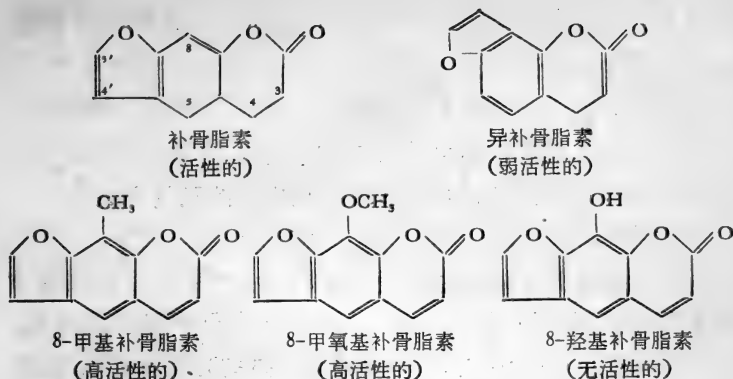


图 4-3 选择出来的一些有光化学活性的和无光化学活性的呋喃香豆素的结构。请注意，在补骨脂素 8 位上用甲基或甲氧基取代将增加其光化学活性，而羟基取代则使活性丧失。在 5 位上的取代也观察到类似的情况。异补骨脂素还叫做当归素，而 8 甲氧基补骨脂素也叫做丙烯酸内酯或黄原毒。

香豆素(由一香豆素核与一呋喃环缩合而衍生出来)是一些高效的光敏化剂。许多呋喃香豆素(以补骨脂素和异补骨脂素为基础)天然存在于某些植物种属之中;图 4-3 给出了某些典型化合物的结构。它不像本章前边所描述的光动力敏化剂那样,呋喃香豆素的光敏化作用不需要分子氧的参加;而且温度对呋喃香豆素敏化的反应速率几乎没有影响。由于类胡萝卜素能够猝灭单线态氧而使其成为抗光动力作用的高效防护剂,但是它和呋喃香豆素一起用就毫无效果。若干对光动力处理很敏感的生物系统不受呋喃香豆素加光的明显影响。例如,呋喃香豆素就不敏化红血球的光溶血<sup>[60]</sup>。

但是,呋喃香豆素确实能敏化一些系统。例如,局部使用或摄入某些呋喃香豆素后用紫外线照射,则使哺乳动物皮肤(包括人)的红斑加剧;造成典型的深色晒黑。这种处理已用于人的化妆上,使在被称作白癜风的病状下出现的皮肤白色区域变暗(参阅第七章);印度早在公元前 1400 年就采用了这

种疗法<sup>[47]</sup>。最近在摄入 8-甲氧基补骨脂素之后用长波紫外线成功地治疗了人的牛皮癣皮肤病；这种“光化学疗法”的转佳效应估计是由于在受影响的表皮层区域内 DNA 的合成和有丝分裂受到抑制的结果<sup>[61]</sup>。在进行这些研究时需加小心，因为据报道在受到了补骨脂素光敏化作用的动物身上产生了皮肤癌<sup>[47,62]</sup>。

呋喃香豆素在细胞水平是有效的光敏化剂，在有呋喃香豆素存在的情况下用 365nm 的光来照射会迅速把细菌杀死；革兰氏阳性菌株是最敏感的，丝毫未观察到光复活<sup>[47,60]</sup>。也可把组织培养的动物细胞杀死。在 365nm 处光照时，呋喃香豆素显著地增加细菌和酵母的突变频率（参阅参考文献 7 第 280 页）。在有补骨脂素存在的条件下光照，将使某些噬菌体和动物病毒完全钝化；一般说来，RNA 病毒抗性更大一些<sup>[47,60]</sup>。

人们进行了各种研究，试图鉴别出那些容易被呋喃香豆素光敏化改变的生物分子，发现能有效地敏化皮肤、细菌等的呋喃香豆素和黄素单核苷酸 (FMN) 发生反应，反应给出丧失辅酶活性的产物。更为重要的是，当用 365nm 照射时发现有关敏化作用的呋喃香豆素与 DNA 反应；用标记的呋喃香豆素进行的研究表明这种反应是一个光键合反应，即紫外光引起呋喃香豆素与 DNA 的连接<sup>[60]</sup>。用核酸碱基进行的研究表明，只有嘧啶碱基及其核苷和核苷酸与呋喃香豆素反应；没有发现嘌呤及其衍生物与之光键合<sup>[60]</sup>。光键合反应与温度有关，不需要氧；事实上，氧和其他顺磁物质降低光键合的反应速率。与自由嘧啶反应形成两种类型的光加成物，反应中碱基的 5,6 双键与呋喃香豆素的 3,4 双键或者 4',5' 双键相连形成环丁烷环。在有 DNA 的情况下照射有光活性的呋喃香豆素，引起核酸的交联；这可能是由于呋喃香豆素的 3,4 双键与一条链内的嘧啶碱基相互作用而其 4',5' 双键与另一条链

内的嘧啶碱基反应造成的，这样的反应发生在细胞以及溶液里。呋喃香豆素与 DNA 的光键合降低了核酸对 RNA 合成的模板活性<sup>[60]</sup>。

#### 4.4.2 其他光敏化反应

对生物系统中不需氧的光敏化反应只作过不多的研究。在某些条件下铈的化合物起到有效的敏化剂的作用。例如，在厌氧条件下有铈酰离子存在时许多有机酸、醇和碳水化合物被光氧化<sup>[63]</sup>。人们对草酸铈酰体系作了大量的研究，多年来它被用来作为一个化学光化计（一种用于测量光强的化学体系）（参阅 1.4.4）；它对于测量紫外线区和蓝光区的辐射是很有用的，这两个光谱区是铈酰离子的吸收区<sup>[63]</sup>。正铁化合物也起敏化作用。例如，在厌氧条件下用波长大于 310nm 的光照射时，在有二价铁离子作为光敏化剂存在时，尿嘧啶核苷、胞嘧啶核苷、胸腺嘧啶核苷及鸟嘌呤核苷被破坏<sup>[64]</sup>；在有铁盐存在下光照时也可钝化烟草花叶病毒 RNA<sup>[65]</sup>。一些光化计也是以正铁草酸盐体系为基础的。

DNA 的紫外线照射导致一系列产物的产生，这些产物都是直接吸收紫外线的结果；特别是在核酸链内产生胸腺嘧啶-胸腺嘧啶二聚体（参阅第 5 章）。用敏化剂如苯乙酮及其衍生物也证明了在 T<sub>4</sub> 噬菌体 DNA 内光化学敏化形成了胸腺嘧啶-胸腺嘧啶二聚体；光敏化剂的三线态能量必须高于胸腺嘧啶，而且这一反应不需要氧<sup>[66]</sup>。这个反应是受从三线态敏化剂到胸腺嘧啶的能量传递调节的；噬菌体被钝化，并产生出突变型噬菌体。此外，一系列的化合物能光敏化二聚体的解聚，它们包括 5-羟色胺、赖氨酰-色氨酰-赖氨酸以及铁氰化钾<sup>[67]</sup>。

## 4.5 结 论

近年来,对光动力反应中包含的初始过程取得了长足的认识,这包括光照引起的敏化剂激发态的产生、激发态敏化剂通过电子传递或氢传递过程与底物的中间反应,以及激发态敏化剂通过能量传递过程与氧反应给出单线态氧。我们对下一步即底物分子氧化的详尽机制方面的有机化学知识是很缺乏的,例如,我们甚至不知道氨基酸的敏化光氧化中涉及的大部分中间产物和最终产物,对于大分子的情况就更加模糊不清了,而在亚细胞、细胞及机体水平上的光敏化方面就几乎完全不知道其细节了。

在不需氧的反应中,我们对辐射激发的呋喃香豆素分子与自由嘧啶及与DNA内的嘧啶在分子水平的相互作用有比较清楚的了解,对光敏化剂把激发能传递给核酸内的胸腺嘧啶残基从而形成胸腺嘧啶二聚体的反应也有了一点了解。但是,关于这些反应对染色体结构及突变和致死机制的总的影响还有很多有待了解的。因此很清楚,在生物学的光敏化反应方面,不仅在机体和细胞水平上,而且在分子水平上尚有大量的工作有待去做。

当然,光敏化现象的研究,从增加我们对这一重要生物学现象的理解的角度来看它也有资格成为重要的研究。此外,光敏化的反应正在成为生物学研究中的一个越来越重要的手段。例如,敏化的光氧化反应可以用来研究蛋白质的结构-功能关系以及蛋白质在溶液中的构象。在某些情况下,通过控制反应条件、采用对某些残基的光氧化有选择性的染料、控制某些残基的“曝露”程度,以及采用与分子内的特定部位相连或结合的敏化剂,都有可能选择性地光氧化某类氨基酸残基,

或者甚至选择性地光氧化蛋白质中特定的某个残基<sup>[18,68]</sup>(参阅参考文献 7 第 137 页)。而且,通过采用专一性结合的敏化剂,以及结合到蛋白质的特定部位的具有不同防护半径的光动力“防护”剂,已使光动力作用用来作为测定溶液中蛋白质的某些氨基酸残基之间空间距离的一种手段<sup>[68,69]</sup>。

光动力技术可以用来选择性地抑制或钝化细胞的特定部分,人们采用几种不同的方法研究亚细胞水平的光动力效应,例如,用集聚在一些局部区域的敏化染料来处理细胞,用光吸收或荧光显微观察的方法来测定染料的位置,然后光照,在照射期间可以观察这些区域的损伤情况<sup>[32]</sup>。像这样在特定的亚细胞部位上光化学产生反应物质的技术在细胞生物、发育生物学等领域可能具有远大的应用前途。另一种方法是用一般方法把细胞染色,然后用一微束光照射某一局部区域<sup>[35,70]</sup>。第三种方法是分离出特定的细胞器,然后在离体条件下研究它们对光动力处理的生化和结构反应<sup>[33,34]</sup>(参阅参考文献 7 第 464 页)。

最后,敏化的光化学反应今后将越来越多地用在应用领域。例如,这样的反应正在开始用于分析测量方面。实际情况是,通过使用某一适当的光敏化反应可以用光方便而快速地产生某一化学试剂。光化学方法化验核黄素<sup>[71]</sup>和诸如抗坏血酸、肾上腺素、烟碱和咖啡碱<sup>[72]</sup>这样的化合物已有过描述。太阳的紫外线使环境中的许多除草剂及防疫剂降解<sup>[73]</sup>;因此在除草剂和防疫剂的分子中参入某些光敏化或光防护的基团以便更精确地控制它们在环境中存留的时间也许是可行的。已经有人建议用光化学技术来清除工业废水中的化学污染物;例如,已经在一些初步的研究里用某些光动力敏化剂来光氧化一种主要类型的有毒水污染物——酚。人们越来越忧虑来源于工农业的含纤维素废物的积累,初步的研究已经表明

光动力敏化剂可以提高畜牧业地区废物的降解速率<sup>[74]</sup>。

为了发展在阳光下不变质的塑料而历来就进行了大量的研究,最近,把光敏化合物掺入用于食物包装、冷饮杯等的塑料中,以便当它们被遗弃在路边或其他室外场地上时将能迅速地光降解。虽然传统上是从防止光引起变质的方面来包装某些饮料和食物,但往往用的却是透明的容器,于是在超级市场的高强度水平的荧光灯下使许多种食品迅速地敏化变质。采用适宜的光吸收物质作为包装和发展一些允许的添加剂以阻止敏感食物成分的敏化光氧化,都可以大大防止这种浪费。正如在 4.3.11 中所述,在治疗表皮肿瘤<sup>[53,54]</sup>以及牛皮癣<sup>[61]</sup>方面,光化学疗法已经取得了一定成功。希望在将来会改进和发展这些技术(参阅第 7 章)。最后,随着我们对光敏化反应中包含的基本机制的进一步了解,也许有可能创造出更好的办法来防止人类身体的光敏化。

## 4.6 实 验

在生物学上光敏化作用的最简单的演示之一是草履虫的光动力致死(Raab 在发现光动力作用时就是使用的这一生物),这个实验可以用许多方式来做;下面的实验指南只应该视为一个总的轮廓。制备  $1 \times 10^{-4}M$  的玫瑰红染料贮液(分子量=974;  $\sim 10mg/100ml$  蒸馏水)。给三个编号 1—3 的样品盘或小瓶每个都加 10 滴培养的草履虫。然后在暗条件下在 1 号样品盘中加 10 滴蒸馏水,在 2 号和 3 号样品盘中加 10 滴玫瑰红溶液,并把它们混匀。立即把 3 号样品盘盖好,并放置于暗处作为暗对照。把 1 号和 2 号样品盘放在光源下,并定时用低倍显微镜来检查。如果把样品盘放置在距 15W 冷白荧光灯泡  $\sim 5cm$  处,那么在 1 分钟之内就会观察到细胞膨胀

和草履虫尾核游泳速率的降低,两分钟左右大多数草履虫就不动了或是反常游动了,在5分钟左右大多数都不动了,并有一些草履虫会发生破裂。使90%或100%的草履虫失去活动性所需的光照时间(以分或秒计)的倒数可以作为光动力停止活动的速率。你不仅应该观察活动性,而且还应该观察细胞的形态学和伸缩胞的行为等等。1号样品盘用作光对照(无染料);当2号样品盘中的大部分草履虫都死亡时,检查暗对照的样品(3号样品盘)中的草履虫。染料溶液可能会在某些培养的草履虫中过分浓集。如果反应进行得很快,或在暗对照中观察到明显的效应,就试用 $3 \times 10^{-5}M$ 或 $1 \times 10^{-5}M$ 的染料液。

这个实验是结果相当分明的,它可以测量出光动力停止活动性和形态改变的发展与染料浓度、染料类型(亚甲蓝、中性红、曙红Y等都可使用)、光强度、光颜色、温度等等的关系。此外,还可以比较一下其他生物的敏感性(其他的原生动物、眼虫藻、溞类、海虾、线虫、小蝌蚪、小鱼等等);也可以用细菌,但是为了测定钝化,必须在光照期间不断地定时取出样品。根据化合物对草履虫光动力停止活动的敏化作用,人们建立了一种非常灵敏的分析空气和水中致癌的碳氢污染物的方法<sup>[75]</sup>。

另一个很简单但引人注意的实验是红血细胞的光动力溶血实验;在有敏化染料存在的情况光照一段足够的时间后发生溶胞,而且散射很强的红血球的不太透明的试管变得相当透明。此实验与上面所讲的实验的不同之处在于所有的溶液都必须用等渗生理盐水配制,以防对细胞的渗透压效应。已经发表了为大学生进行光动力溶血实验用的一本详细的讲义<sup>[76]</sup>。

(郭绳武译 沈 恂校)

# 第5章 紫外线对分子和细胞的效应

Kendric C. Smith

(斯坦福大学医学院放射学系)

5.1	序言 .....	137
5.2	核酸的光化学 .....	138
5.2.1	紫外线对脱氧核糖的效应 .....	139
5.2.2	紫外线对嘌呤的效应 .....	140
5.2.3	嘧啶的水化产物 .....	140
5.2.4	胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶的环丁烷型二聚体 .....	141
5.2.5	嘧啶的其他光化学反应 .....	145
5.2.6	DNA 内的大分子变化 .....	146
5.2.7	DNA 与蛋白质的交联 .....	147
5.2.8	RNA 的光化学 .....	149
5.2.9	结论 .....	150
5.3	氨基酸和蛋白质的光化学 .....	150
5.3.1	氨基酸的相对光化学敏感性 .....	150
5.3.2	蛋白质的一般光化学反应 .....	153
5.3.3	酶的光化学钝化 .....	154
5.3.4	结论 .....	156
5.4	光化学损伤的修复 .....	157
5.4.1	引言 .....	157
5.4.2	关于光化学损伤的修复机制 .....	159
5.4.3	结论 .....	167
5.5	致突 .....	168
5.5.1	DNA 上导致突变的变化 .....	168



5.5.2	致突的分子机制 .....	169
5.5.3	研究致突所用的方法 .....	170
5.5.4	校正基因的突变 .....	171
5.5.5	对温度敏感的突变型 .....	172
5.5.6	结论 .....	172
5.6	实验 .....	172
5.6.1	核酸的光化学 .....	172
5.6.2	紫外存活曲线和光复活 .....	173

## 5.1 序 言

紫外(UV)线的有害效应已有充分资料证明,这种有害效应看来主要是通过紫外线对脱氧核糖核酸(DNA)的作用造成的。当然,最有害的效应是细胞致死,其他的效应则包括致突,致癌,DNA、核糖核酸(RNA)和蛋白质合成的干扰,细胞分裂的延迟,以及在通透性和能动性上的变化。除了在人的皮肤中产生维生素D以外,还没有充分资料证明紫外线的有益效应(参阅7.6)。

紫外线是 J.W. Ritter 于 1801 年发现的,他在研究不同波长的光使氯化银变黑的时候观察到,可见光谱的紫端(380 nm)稍往外的不可见区域比可见光更为有效。1877 年人们第一次观察了紫外线对生命系统的效应,当时 Downes 和 Blunt 报道了细菌的钝化。在 1928 年是第二个里程碑,当时 Gates 发现,对杀死细菌而言不同波长辐射的相对效率(即致死的作用光谱)平行于核酸碱基的吸收光谱。

对核酸的早期光化学研究主要涉及嘧啶环的破坏性劈开;而在 1949 年 Sinsheimer 和 Hastings 发现,嘧啶可以发生可逆的光化学反应。后来弄清楚了这种光化学反应是嘧啶的

5,6 双键上加上了一个水分子。在 1960 年 Beukers 和 Berends 观察到紫外线引起 DNA 的一条链上两个相邻胸腺嘧啶残基的稳定联结。形成胸腺嘧啶二聚体的这一发现重又激起对紫外光生物学的兴趣,并延续至今。由于看到了胸腺嘧啶二聚体对生物失活的重要性,因此造成了一种过多研究胸腺嘧啶二聚体的紫外光生物学的倾向。在细胞的核酸内产生的还有许多其他类型的光产物,这些产物之中有的已被分离出来并描述出其特征。在某些情况下,还确定了它们的相对生物学重要性。

在细菌对紫外线致死的敏感性上,不同的株系差别极大。大肠杆菌 K 12 *recA uvrB* 是一个缺少两种类型 DNA 修复系统(在 5.4.2 里将要讨论)的突变株,注量为  $0.1\text{J}/\text{m}^2$  的 254nm 的紫外线把它杀死到 10% 的存活水平,要杀死到同样的存活水平,对单突变株 *uvrB* 需要  $9.5\text{J}/\text{m}^2$ ,对单突变株 *recA* 需要  $5.8\text{J}/\text{m}^2$ ,而对野生型母株则需要  $68.0\text{J}/\text{m}^2$ 。因此,在大肠杆菌 K 12 里,不同菌株的敏感性几乎相差 700 倍,而敏感性取决于它们修复 DNA 光化学损伤的能力。

目前,在紫外光生物学领域研究的重点主要是关于细胞通过什么机制修复其 DNA,以及在产生突变时错误的修复所可能起的作用。在本章里也将体现这一重点。

## 5.2 核酸的光化学<sup>[4-8]</sup>

现在可以依据在 DNA 上特殊的化学和物理变化来解释许多紫外线的生物学效应。但是,并非在所有的实验条件下 DNA 对紫外线都表现出同样的敏感性。通过种种生物的(例如细胞的生长状况)、化学的(例如碱基类似物取代)及物理的(例如变性、冷冻、干燥)技术可以改变 DNA 对光化学变化

的固有敏感性。例如,在紫外线照射的细菌细胞里一种产额很高的光产物看来是引起细胞死亡的主要原因,但是在细菌孢子里它产生的并不多。使受照射的生长细胞和孢子失活的看来是不同类型的光产物。因此,不能简单地说 DNA 上的哪一种光产物是最重要的,它取决于不同的实验条件和不同的受照射细胞。

除了 DNA 的固有敏感性外,我们还必须考虑到细胞修复其损伤的能力。如果某一种损伤被细胞准确和定量地修复了,那么这一损伤对该细胞就不会有生物学重要性,而那些不可修复的(或未被修复的)损伤才是有生物学意义的。

### 5.2.1 紫外线对脱氧核糖的效应

虽然糖类构成核酸重量的约 41%,但它们在 230nm 以上的波长基本上无紫外线吸收,因而在用大于 230nm 波长的光照射时就不可能期望其发生光化学反应。

紫外线对脱氧核糖的直接效应已有过报道。如果 5-溴尿嘧啶(BrUra)取代细胞 DNA 内的胸腺嘧啶,那么这个细胞对紫外线的致死就敏感得多。紫外线对 DNA 中 BrUra 的一个效应是脱溴,随之产生一尿嘧啶自由基。在无别的氢供体情况下,它就会从邻近的脱氧核糖抽提出一个氢原子。这就导致尿嘧啶的产生和脱氧核糖的破坏(通过目前未知的机制),最后导致 DNA 的链断裂<sup>[9]</sup>。在有敏化剂酮存在的情况下,例如二甲苯酮,也会产生 DNA 的链断裂。当用 313nm 的光激发这些试剂时,它们就可以从水中抽提出氢原子而产生羟基自由基,然后羟基自由基攻击 DNA 并产生链断裂<sup>[10]</sup>。因此,在一定的条件下,当核酸受到紫外线和近紫外光照射时,即使光子的初始吸收并不发生于糖上,也还是可以导致核酸的糖上的化学变化。

### 5.2.2 紫外线对嘌呤的效应

在纯溶液中，嘌呤抗光化学变化的能力要比嘧啶约大 10 倍。因为在对光化学变化的敏感性上的这一差别意味着，在大量的嘌呤损伤出现之前细胞就已经由于嘧啶损伤而失活，所以嘌呤的光化学没有生物学上的重要性。虽然在统计学上这一假定很可以成立，但还不能就这样匆忙排除嘌呤光化学的生物学意义。虽然嘌呤吸收紫外线并不引起嘌呤环高效的化学变化，但它吸收的能量的一部分可能会传递给嘧啶或 DNA 的糖-磷酸主链，并因此而导致化学变化。胸腺嘧啶自由基的形成和多聚脱氧腺苷-脱氧胸苷中胸腺嘧啶的磷光都与来自腺嘌呤的能量传递有关。

但是核酸在细胞内部并非纯溶液，同时 Elad 等人已经证明，嘌呤容易与其他有机化合物发生光化学反应。事实上，在进行这些杂加成反应上，嘌呤比嘧啶有更大的光化学反应活性。只是在最近，人们才了解到这些杂加成反应在生物学上的重要性<sup>[7]</sup>。

### 5.2.3 嘧啶的水化产物

当尿嘧啶及其衍生物的溶液受紫外线照射时，它们就丧失其特征的紫外吸收，但通过热、碱或酸处理大体上都可以恢复。有人假定尿嘧啶 5,6 双键的水化作用可能是吸收谱丧失及随后用酸或热处理可以复原的原因。当人们合成出了 6-羟

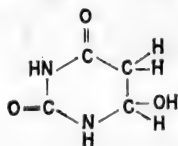


图 5-1 6-羟基,5-氢尿嘧啶。

基,5-氢尿嘧啶 (图 5-1), 且证明它与尿嘧啶的可逆辐射产

物是一样的(注意: 5-羟基, 6-氢尿嘧啶对热是稳定的)之后, 终于证实了这个假定。还会生成胞嘧啶和胸腺嘧啶的光化学水合物, 但这些水合物(特别是胸腺嘧啶的水合物)与尿嘧啶衍生物相比是极不稳定的。

根据 240nm 附近出现的热可逆吸收峰, 人们推断在受照射的变性 DNA 内形成了胞嘧啶的水加成光产物。二氢胞嘧啶衍生物(即无 5,6 双键)在这个波长有一特征吸收峰。但是, 照射的天然 DNA 就没有这样的热可逆的吸收峰。其他一些资料也说明, 在照射的双链 DNA 内可能形成不了可以测量出的胞嘧啶水合物, 而在单链 DNA 的情况则形成胞嘧啶水合物。但是, 其他的光产物(如嘧啶二聚体)可能使 DNA 变形并产生局部变性(即单链区), 因此可能会在这种局部变性的双链 DNA 中形成水合物。

在 DNA 的复制和转录期间, 可能有短的单链区, 在这些区域嘧啶水合物的形成可能很重要。在离体模式系统中已经证明嘧啶水合物可能在引起突变上起作用<sup>[12]</sup>。多聚胞苷酸受紫外线照射时, 它在 RNA 聚合酶系统中的编码特性发生变化。受照射的多聚胞苷酸丧失其为鸟苷酸参入进行编码的能力, 除非在系统中加入腺苷酸。随着紫外线注量的增加, 腺苷酸在多聚胞苷酸中的参入亦增加, 由于这种参入的增加在已知是使嘧啶水合物脱水的条件下是热可逆的, 因此人们认为编码改变可能是形成胞嘧啶水合物的结果(即胞嘧啶水合物是与腺嘌呤进行碱基配对, 而不是与鸟嘌呤碱基配对)。因此, 在 DNA 的单链区水合物的形成可能在产生突变中具有重要意义。

#### 5.2.4 胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶的环丁烷型二聚体

用紫外线(254nm)照射胸腺嘧啶的水溶液时, 胸腺嘧啶

便失去其特征的吸收性质，失去的速率约为尿嘧啶受照射时丧失特征吸收的速率的十分之一（对于胸腺嘧啶  $\phi = 0.4 \times 10^{-3}$ ）。如果把胸腺嘧啶溶液冷冻，然后用紫外线照射，光化学反应性就会大大增加（ $\phi = \sim 0.2$ ），而且所形成的主要产物是二聚体。冷冻的效应可能是使胸腺嘧啶分子沿一定方向平行排列，从而有利于双分子光化学反应。

为形成胸腺嘧啶二聚体（图 5-2），两个胸腺嘧啶分子就

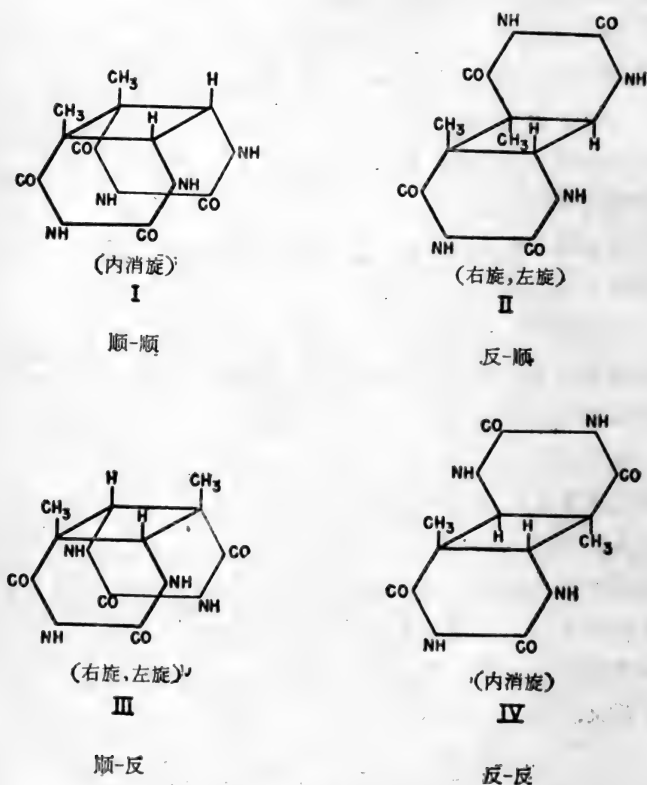


图 5-2 环丁烷型胸腺嘧啶二聚体的异构体。

II 型和 III 型是可能的旋光异构体。

要通过其各自的 5 和 6 位碳原子互相连接起来, 这样在两个胸腺嘧啶之间就形成一环丁烷环(四碳环)。胸腺嘧啶二聚体有六种可能的异构体, 从照射的胸腺嘧啶低聚物中已经把它们分离出来。I 型(顺-顺)胸腺嘧啶二聚体(图 5-2)是在 DNA 的同一链中相邻的胸腺嘧啶之间形成的一种二聚体。在这些异构体中, 有些对酸水解是稳定的, 而另一些则不然。由于酸水解是从受照射的 DNA 中分离出光产物的一种常用方法, 这样就会破坏不稳定的光产物。

环丁烷型胸腺嘧啶二聚体的形成和单体化与波长有关。在注量足够的紫外线照射之后, 在单体和二聚体之间达到稳态平衡, 这种光稳态与所用的波长有关。波长较长(280nm 左右), 有利于二聚体形成, 波长较短(240nm 左右), 则有利于单体形成。这一反应是由于胸腺嘧啶和它的二聚体的吸收谱(图 5-3)的不同以及在形成二聚体和裂解二聚体的量子产额上的差别造成的。

已知还有另外五种环丁烷型的天然嘧啶的二聚体。它们是尿嘧啶二聚体、胞嘧啶二聚体、尿嘧啶-胸腺嘧啶、胞嘧啶-胸腺嘧啶, 以及尿嘧啶-胞嘧啶。不仅由于水合反应的竞争, 而且还由于胞嘧啶的 5,6 双键饱和时容易脱氨基, 所以使胞嘧啶二聚体的分离较为复杂。因此胞嘧啶二聚体很容易转化为尿嘧啶二聚体。显然, 如果在细胞 DNA 中的一个胞嘧啶二聚体脱氨基形成一个尿嘧啶二聚体, 而且之后此二聚体又被光复活酶在位劈开(参阅下文), 那么由于尿嘧啶残基与腺嘌呤而不是与鸟嘌呤碱基配对, 所以可能产生突变。

到现在为止, 我们讲述了由于反应物直接吸收光子而发生的光化学反应。但是, 不被胸腺嘧啶吸收的波长的光也能形成胸腺嘧啶二聚体, 只要胸腺嘧啶与那些吸收这些波长的适当的分子一起存在。这种过程叫做三线态光敏化作用(参

阅 2.7)。它要求吸收光的物质(光敏化剂)的三线态在能量上要高于胸腺嘧啶的三线态。在碰撞时,敏化剂的三线态能量传递给胸腺嘧啶,产生的处于其三线态的胸腺嘧啶就有随后形成胸腺嘧啶二聚体的可能性。这种情况的例子是:当 DNA 在有  $10^{-2} M$  苯乙酮存在的条件下受照射,或当细菌悬浮于 10% 的丙酮里受照射,波长在 300nm 以上的光都能形成胸腺

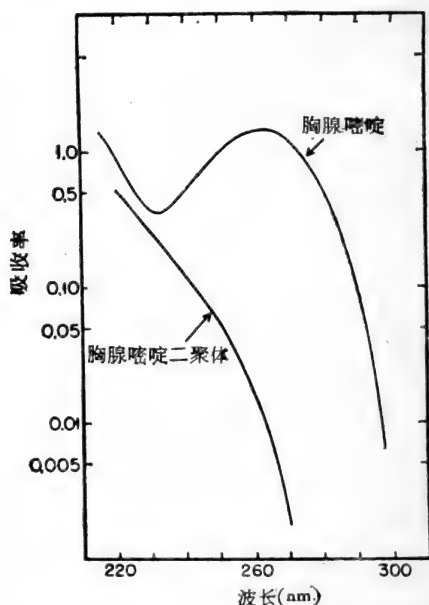


图 5-3 胸腺嘧啶 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 和钝化的胸腺嘧啶二聚体 (34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的吸收光谱。[转引自 R. Setlow, *Biochem. Biophys. Acta*, **49**, 237, (1961)]

嘧啶二聚体。利用三线态光敏化作用来驱动某一反应的一个优点是,它可以在不出现逆反应(二聚体裂解)的波长下进行。利用这一技术,我们将能基本上定量地把相邻的胸腺嘧啶残基转变成二聚体,而用直接激发胸腺嘧啶残基的办法只能得到一个平衡的产额。



## 5.2.5 嘧啶的其他光化学反应

除了水合物或环丁烷型二聚体外，在活体及离体条件下还会产生许多其他的嘧啶光产物，不过一般产额都很低。这些光产物之中有些是单体的，而另一些则具有双分子性质。大部分这些光产物的化学结构和相对的生物学重要性还有待测定<sup>[1,4-7]</sup>。

所谓“孢子光产物”值得特别注意(图 5-4)。在高注量的紫外线(在 254nm,  $2 \times 10^4 \text{J/m}^2$ ) 的照射之后,在细菌孢子内约 30% 的胸腺嘧啶可以转化为这种产物。孢子光产物没有环丁烷型胸腺嘧啶二聚体的短波逆转特性。因此,在孢子中这种产物的产额可以达到一个最大值,它由 DNA 内最接近的胸腺嘧啶的数目决定。但是,环丁烷型二聚体的最大产额取决于二聚体的形成和裂解之间的平衡。因此,在照射的大肠杆菌中,理论上有 30—40% 的胸腺嘧啶可形成二聚体,但实际上即使用注量很高的 254nm 紫外线照射之后也仅有 15% 左右的胸腺嘧啶形成二聚体。

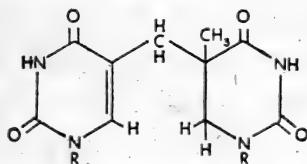


图 5-4 “孢子光产物”(5-胸腺嘧啶酰-5,6-二氢胸腺嘧啶)。

在孢子发芽期间,孢子光产物的产额降低,而环丁烷型二聚体的产额增加,同时对紫外线致死的敏感性增加。环丁烷型嘧啶二聚体在杀死生长的细胞上比孢子光产物在杀死孢子上的效率,看来要高出 11 倍左右。这可能意味着孢子光产物比环丁烷型二聚体能更为有效地得到修复。

嘧啶(及嘌呤)也会与其他化合物进行光化学反应。例

如，醇(R—OH)及半胱氨酸(R'—SH)，这种氨基酸经光化学反应加成在嘧啶的5,6双键上。由于甲醇和乙醇的加成产物可以用酸逆转，所以它们似乎类似于前面讲过的水(H—OH)的加成产物，因而估计是加在6位碳上。已经知道半胱氨酸加到5位上并形成一稳定的产物(图5-5)。

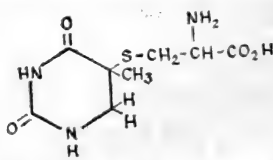


图5-5 5-S-半胱氨酸,6-氢胸腺嘧啶。

## 5.2.6 DNA 内的大分子变化

虽然X射线在产生DNA的单链和双链断裂上是很有效的，而紫外线在这一点上却是效能很低的，如有敏化剂如二苯甲酮存在时情况就不同了(参阅5.2.1)。但是，在紫外线照射的细胞内，作为受损伤的DNA修复中必须的阶段，DNA的链在酶的作用下迅速断裂。

如果DNA在干燥状态受紫外线照射，或在其很紧密地堆积在一起时，如在精子头部那样的情况受到紫外线照射，就会观察到形成凝胶的DNA-DNA交联。但是，这种类型的反应对正常的含水细胞似乎没有什么重要性。

当DNA由于加热或甲酰胺处理而变性时，另一种类型的DNA-DNA交联的DNA分子的两条链互相连接而不再能分开。因为在受照至1%存活的正常噬菌体T<sub>7</sub>中探测不到链间的交联，所以这种损伤的生物学重要性看来在低注量的紫外线时还有疑问。但是，在高注量的紫外线情况下，在那些相当抗辐射的细胞中这种损伤可能具有较重要的生物学意义。

### 5.2.7 DNA 与蛋白质的交联<sup>[1,4,7]</sup>

随着紫外线注量的增加,从细菌和哺乳动物细胞中所能提取的不含蛋白质的 DNA 的量则不断减少。根据沉降物中所含的变性蛋白质,可以定量地算出有多少 DNA 由于紫外线照射而变为不可提取的,但是用胰蛋白酶处理此沉淀物则得到游离的 DNA。这些结果表明,紫外线引起了 DNA 与蛋白质的交联。更为直接的证明来自一些离体实验,这些实验证明在离体条件下紫外线能使 DNA 和蛋白质发生交联。

在活体内,DNA 和蛋白质发生交联的确切的化学机制还不清楚;但是,从离体紫外线照射的胸腺嘧啶和半胱氨酸溶液中分离出来的一种胸腺嘧啶和半胱氨酸的混合光产物(5-S-半胱氨酸、6-氢胸腺嘧啶)(图5-5)可以用来作为交联现象的一种可能的模型。半胱氨酸还可以通过光化学反应接到多聚尿苷酸(Poly-rU)、多聚脱氧胞苷酸(Poly-dC)、多聚脱氧胸苷酸(Poly-dT)、RNA 和 DNA 上。

除半胱氨酸外,下列氨基酸也可以通过光化学反应与胸腺嘧啶加成:精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、色氨酸及胱氨酸。下列氨基酸可以通过光化学反应与尿嘧啶加成:谷氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。其他常见氨基酸在此实验条件下则不反应。

最能证明 DNA-蛋白质交联的生物学重要性的实验是冷冻条件下照射细菌细胞的那些实验。大肠杆菌 B/r 细胞在紫外线照射后的存活率与受照射时的温度有很大的关系(图5-6),当把温度从+21℃降低到-79℃时,细菌对紫外线的敏感性增加,存活曲线的肩和斜率都发生改变,在-196℃下,细胞不像在-79℃时那样敏感,但由于存活曲线上没有肩区,所

以还是比在  $+21^{\circ}\text{C}$  时更敏感。

当细胞受照时的温度从  $+21^{\circ}\text{C}$  降到  $-79^{\circ}\text{C}$  和  $-196^{\circ}\text{C}$  时, 环丁烷型胸腺嘧啶二聚体的形成速率不断减小。因此, 胸

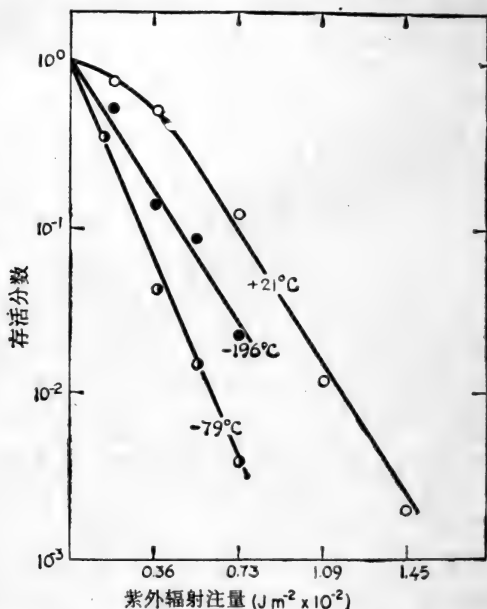


图 5-6 在不同温度下, 大肠杆菌 B/r 的存活率与紫外线 (254nm) 注量的函数关系 [转引自 K. C. Smith and M. E. O'Leary, *Science* **155**, 1024, (1967)]。

腺嘧啶二聚体的产额与  $-79^{\circ}\text{C}$  和  $-196^{\circ}\text{C}$  下照射时大肠杆菌致死率的增加之间没有任何相关性。这说明环丁烷型胸腺嘧啶二聚体在导致冷冻条件下受照射的细胞死亡的事件中不像其在室温下那样起重要作用。这些结果进一步证明, 依生长和照射条件的不同, 某一确定的光产物的相对生物学重要性可能有很大的改变。

但是与此相反, 与蛋白质交联的 DNA 的量作为照射时温度的函数却与存活率的变化有着同样的趋势。因此, 当细胞

在冷冻时受照射,看来与其生活力相关的光化学事件是 DNA 与蛋白质的交联。冷冻可能会改变细胞内的蛋白质和 DNA 的构型或接近程度,从而因照射而形成 DNA-蛋白质交联的可能性大大增加,因此在这些条件下就观察到较高的致死效应。

微球菌 *Micrococcus radiodurans* 是已知的抗辐射能力最强的一种生物,杀死它的作用光谱与杀死较为敏感的生物大肠杆菌的作用光谱显著地不同,其差别在于此微球菌对 280nm 和 260nm 的光照有很高的敏感性。按经典的观点,在 280nm 处的反应表示牵涉到蛋白质的情况,而在 260nm 处的反应则说明与核酸有关。因此,人们认为这种生物对紫外线的抗性是由于其极强的修复嘧啶二聚体的能力,而最终导致这种生物死亡的是涉及到 DNA 和蛋白质两者的损伤。DNA 和蛋白质的交联可能构成这种损伤的一种类型。

我们有理由认为,当蛋白质和 DNA 一起受照射与它们分别受照射时相比较可能会产生不同类型的光化学反应。由于 DNA 和蛋白质并不是以单独分子的纯溶液存在于细胞之中,而是处于彼此密切接触之中,所以可以预料,在某些条件下 DNA 和蛋白质(及其他分子)间的光化学反应在紫外线照射的细胞失活上可能起着重要作用<sup>[1,4,7]</sup>。

### 5.2.8 RNA 的光化学

RNA 与 DNA 的不同在于核糖取代了脱氧核糖、尿嘧啶代替了胸腺嘧啶,以及具有更多的单链区段。这些差别影响着 RNA 的光化学(例如形成更多的嘧啶水化物),但一般说来它相当类似于 DNA。

RNA 在体内的光化学不像 DNA 的光化学研究得那样广泛。从 DNA 对细胞存活的极大重要性来看,这或许是可以理解的。由于 RNA 分子在细胞里一般有多个复制品,所以这

些分子的百分之几被钝化将不会像 DNA 的一小部分的光化学变化那样对细胞产生那么不利的影响。尽管如此,在一些特殊的情况下, mRNA 和 tRNA 的光化学变化对细胞可能会造成严重的后果(参阅 15.7.2.1)。

某些病毒含有作为遗传决定因素的 RNA (如烟草花叶病毒),对于这样的病毒,其 RNA 的光化学变化导致它们迅速地钝化。人们用 RNA 病毒极为广泛地研究了紫外线对 RNA 的生物和化学效应<sup>[4]</sup>。

### 5.2.9 结论

我们对细胞内嘧啶二聚体形成的化学和生物学后果的了解是相当完善的,但是对核酸光化学的兴趣已经多少有所下降。关于许多非环丁烷型嘧啶光产物及其生物学重要性我们知道得很少,关于嘌呤光化学也是如此。

虽然可能有的嘌呤和嘧啶的单体和二聚体的光化学变化类型的绝对数目是有限的,但是可能有的 DNA 的光化学加成物的数目却几乎是无限的。目前,对 DNA 杂加成反应领域重又有了兴趣(例如,蛋白质与 DNA 的交联、对于 DNA 的致癌物等等),因为它们与衰老、致癌及光生物学有关<sup>[7]</sup>。因此,在核酸的光化学领域至今仍在作出许多令人兴奋的发现。

## 5.3 氨基酸和蛋白质的光化学<sup>[1,8,13,14]</sup>

### 5.3.1 氨基酸的相对光化学敏感性

由于必须吸收光以后才能发生光化学过程,那么就有理由认为,对于在光生物学中通常使用的波长(即  $> 240\text{nm}$ )是透明的那些氨基酸在这些波长下将极少进行或不进行光化学反应。这样就基本上把脂肪族氨基酸排除于我们考虑的范围

之外。虽然我们应该想到,吸收的光不一定必然导致光化学反应(即吸收的能量以热或通过荧光或磷光无害地散失),但芳香族氨基酸对 240nm 以上波长辐射的强烈吸收无疑说明了它们的光化学的重要性。

有两个在单体氨基酸中没有而出现在蛋白质中的发色团:肽键和二硫键。肽键的吸收谱在 180—190nm 区域出现一个峰,在较长波长则迅速降低。但是甚至在 254nm 时,肽键断裂的量子产额都有很大的数值(表 5-1)。

一度曾认为半胱氨酸和胱氨酸在光化学上不重要,因为根据其在酸性溶液中的吸收谱来看,它们在 230nm 以上基本上是光学透明的。然而在中性和碱性 pH 条件下,这些化合物的吸收甚至在 250nm 以上波长都变得很明显了。这一事实再加上它很高的光化学变化的量子效率,使得胱氨酸成为影响蛋白质功能的最为敏感的靶。

如果一个化合物的摩尔吸收率(摩尔消光系数)( $\epsilon$ )是该化合物吸收特定波长光的机率的一个量度,而量子产额( $\phi$ )是吸收的光引起化学变化的几率,那么这两个值的乘积( $\epsilon \times \phi$ )就是该化合物的光化学敏感性的一个量度(参阅 1.5.2)。表 5-1 给出了蛋白质中最重要的发色团在 254nm 处这些参数的值。当蛋白质中存在胱氨酸时,它就是最不稳定的靶。这时不稳定性由高到低的次序是:色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、肽键及组氨酸。但应着重指出,在其他波长紫外线的敏感性(由于  $\epsilon$  和  $\phi$  的改变)将有改变,于是这些靶在某一特定蛋白质的光化学钝化上的相对重要性亦发生改变。

对氨基酸的大多数早期的光化学研究都没有采用单色光,而光化学变化的分析靠的是容易测量的最终分解产物如氨、二氧化碳、硫及光谱特性的丧失。然而,这些数据提供不了多少关于在生物学上有意义的那些紫外线剂量下发生的反

表 5-1 在 254nm 处氨基酸的相对光化学敏感性<sup>a</sup>

化 合 物	$\epsilon$	$\phi$	$(\epsilon \times \phi)$
胱氨酸(—S—S—键)	270	0.13	35.1
色氨酸	2870	0.004	11.5
苯丙氨酸	140	0.013	1.8
酪氨酸	320	0.002	0.6
肽键(乙酰丙氨酸)	0.2	0.05	0.01
组氨酸	0.24	<0.03	<0.0072

- a. 数据引自参考文献 8, 97 页。  $\epsilon$  是在 254nm 处的摩尔吸收率 (给定的化合物吸收 254nm 辐射的几率);  $\phi$  是在 254nm 处的量子产额 (吸收的 254nm 的辐射引起化学变化的几率);  $(\epsilon \times \phi)$  是某一个氨基酸光化学敏感性的度量。

应的有用信息。在最近关于苯丙氨酸的光化学研究中 (用放射性  $^{14}\text{C}$  选择性地标记在不同的部位) 证明, 在芳香族氨基酸残基的最大吸收波长 (258nm) 处照射苯丙氨酸时形成了酪氨酸、二羟基苯丙氨酸 (Dopa)、天冬氨酸、苯甲酸、苯基乳酸以及高分子量的黑素多聚物。以最大量子效率发生的反应是通过脱羧作用放出二氧化碳, 这些结果表明存在侧链碳键的断裂, 并且由于所有的能量最初都是被苯环吸收的, 因而有理由推论必然存在着能量的迁移。

人们认为, 蛋白质中激发 (即电子能量) 的迁移部分地通过共振传递机制发生, 如果供体和受体之间的距离足够小 ( $\sim 10\text{nm}$ ), 同时此二者之间的相对方位又适当, 那么荧光光谱与能量受体的吸收谱有重叠的供体就可以把电子能量传递给受体。由于能把苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的发射谱区别开来, 所以蛋白质的荧光光谱就可以给出在这些氨基酸之间能量传递方向的信息。虽然几乎总是可以观察到酪氨酸组分的荧光, 但大多数蛋白质却观察不到苯丙氨酸的荧光。然而, 酪



酸荧光对于那些含有色氨酸的蛋白质的总荧光仅仅贡献一小部分。因此,能量传递看来是从苯丙氨酸到酪氨酸再到色氨酸这样进行的(参阅 2.7.4)。

在上面提到的对苯丙氨酸所描述的那类化学研究中,分离并鉴定了这种氨基酸光化学变化的原初产物,除此之外还有一些采用闪光光解、电子顺磁共振技术以及发射光谱的更精巧复杂的研究,这些研究阐明了导致光产物的某些光化学中间产物。已经证明芳香族氨基酸(RH)由于被击出一个水合电子而发生光电离( $\text{RH}^{\cdot-}$ )。阳离子自由基( $\text{RH}^{\cdot+}$ )能够分解而产生一个中性自由基( $\text{R}^{\cdot}$ )和一个氢离子( $\text{H}^+$ )。然后中性氨基酸自由基和水合电子可以进行互相反应,也可以与其他分子反应产生多种产物<sup>[13]</sup>。胱氨酸破坏的产额在含有色氨酸的蛋白质内要高得多,有证据说明色氨酸敏化胱氨酸的光化学变化是通过放出电子的机制。最容易与水合电子反应的氨基酸是胱氨酸,这一事实与此观察结果也是一致的<sup>[13]</sup>。

很早我们就已经知道,X射线的主要作用是产生自由基,因而辐射化学实际上是自由基的反应化学。一般还不了解某些类型的光化学反应(如上所述)也导致自由基的产生,而且不论是以光化学方式产生的或以别的方式产生的自由基都进行其本身特征类型的反应。因此,光化学和辐射化学比乍看起来的情况更有共同之处。

### 5.3.2 蛋白质的一般光化学反应

当蛋白质受到紫外线照射时,形成的较低和较高分子量的产物都有,溶解度发生变化,对热变性的敏感性增加,胰蛋白酶对它的消化率增加以及光学和物理特性发生改变。但是一般说来,要在比使酶钝化高很多的紫外线注量下才出现这些变化<sup>[1,8]</sup>。

### 5.3.3 酶的光化学钝化

长期以来建立了两种不同的酶的钝化机制的理论, McLaren 和 Hidalgo-Salvatierra 认为:作为一级近似,任何氨基酸残基的改变都会引起酶的钝化。如果把各个氨基酸的量( $\epsilon \times \phi$ ) (它是每种氨基酸的光化学敏感性的一个量度,参阅表 5-1) 乘以该氨基酸在蛋白质中的数目( $n$ ),然后把它们相加并除以酶的摩尔吸收率,我们就能算出使酶钝化的量子产额,这个计算值在某些情况下很接近于观测到的量子产额。在表 5-2 中所列出的 10 种蛋白质中,有 7 种所计算的量子产额与实验测定值相差不超过一倍。对于羧肽酶、胃蛋白酶和胰岛素就不大符合这个假设了。

作者们自己已经指出了这些计算的某些缺点,因为不能保证每一种氨基酸的摩尔吸收率或者量子产额(在给定 pH 和波长下)在蛋白质中和在游离溶液中都是相同的;实际上,有些证据表明,当氨基酸参入蛋白质时这些数值便发生了变化。此外我们知道,在一给定的蛋白质内并不是所有的氨基酸残基对于酶的功能都具有同等的重要性。

对于研究过的少数几种蛋白质来说,虽然在其他波长上存在较大的差别,但在 254nm 波长上的吸收与游离氨基酸的当量混合物的吸收没有显著差别,这一事实加上在表 5-2 中引证的计算和测定的量子产额之间相当一致就可以认为,在一定的条件下,氨基酸残基实际上是不受其周围分子影响的独立的光吸收体。因此,McLaren 等人得出结论:为了解释光化学钝化不一定要求助于在酶分子内发色团之间的能量传递。

但是,Augenstein 和 Riley 对于这一结论表示反对<sup>[16]</sup>。他们提出一种理论,认为紫外线使酶钝化是由于特异胱氨酸残

基的破坏和维系酶的活性中心空间完整性的氢键破坏的结果。他们的理论强调在此过程中能量迁移的重要性。与这些假定相一致的是这样的观察结果，核糖核酸酶上的光化学损伤

表 5-2 计算的和实验得到的 254nm 的紫外线使酶钝化的量子产额<sup>a,\*</sup>

蛋 白 质	发 色 团					量 子 产 额	
	Cys	His	Phe	Trp	Tyr	实验值	计算值 <sup>b</sup>
1. 羧肽酶	2	8	15	6	20	0.001 <sup>c</sup>	0.01
2. 胰凝乳蛋白酶	5	2	6	7	4	0.005	0.01 (0.007) <sup>d</sup>
3. 溶菌酶	5	1	3	8	2	0.024	0.014 (0.0097) <sup>d</sup>
4. 胃蛋白酶	3	2	9	4	16	0.002	0.01 (0.006) <sup>d</sup>
5. 核糖核酸酶	4	4	3	0	6	0.027	0.03 (0.026) <sup>d</sup>
6. 枯草杆菌蛋白酶 A	0	5	4	1	13	0.007	0.0051
7. 枯草杆菌蛋白酶 B	0	6	3	4	10	0.006	0.011
8. (Japanese Nagarse)	0	6	3	4	10	0.007	0.01
9. 胰蛋白酶	6	1	3	4	4	0.015	0.02 (0.014) <sup>d</sup>
10. 胰岛素	18	12	18	0	24	0.015	0.06

a: 数据取自参考文献 15。

b.  $\phi_{ENZ} = \sum_i n_i \epsilon_i \phi_i / \epsilon_{ENZ}$  (参阅 5.3.3)。

c. R. Piras 和 B. L. Vallee 对羧肽酶的量子产额重新作了测定 [Biochemistry 6, 2269 (1976)], 为 0.0049, 这就使计算值(0.01)与观测值相差一倍左右。更新的资料指出(据 Piras 和 Vallee 的引证), 羧肽酶不含二硫键(S—S)。

d. 如果在计算中只采用胱氨酸残基而不是用所有吸收紫外线的氨基酸, 在观察和计算的量子产额之间常可得到更好的吻合。作为一种特殊条件下的公式, 这样做是允许的。但是必须说明, McLaren 和 Hidalgo-Salvatierra 所说的那段话——“在蛋白质内吸收量子的部位和光化学反应的部位是同一部位, 而且不需要求助于在吸收分子内吸收的能量从一种生色团迁移到另一种生色团的机制”<sup>[15]</sup>, 不是对所有蛋白质都能成立的。

\* (1) 表内 Cys 数指的是胱氨酸, 而不是半胱氨酸; (2) Japanese Nagarse 是日本产的一种酶的商品名; (3) 核糖核酸酶的 Tyr 数原文 16 系误写。

是非随机的;在其活性丧失之前,四个组分胱氨酸之中至少两个或许三个必然受到破坏,也就是说对光最敏感的胱氨酸对于酶的活性并不每个都是关键的。

胰蛋白酶和溶菌酶的情况与此类似,对光最敏感的胱氨酸的完整性看来对于保持酶的活性也不是关键性的。但是在胰岛素,所有三个胱氨酸看来对其活性都是关键性的,而且有大约相等的光敏感性。在不同的蛋白质中胱氨酸敏感性上的这些差别必然特异性地依赖于发色基团之间的能量传递和化学反应。胱氨酸的破坏在含有色氨酸的那些蛋白质中要大得多。有证据说明,由于酶的三级结构而不是其一级结构使靠近色氨酸的胱氨酸成为对光最敏感的胱氨酸。

关于紫外线照射使酶钝化的机制,虽然在我们面前看来有两个相反的结论,但是下这样的结论或许更为恰当:这种理论对这种酶是正确的,那种理论对那种酶也是正确的。在某些氨基酸能够作为与其他组分独立无关的吸收体看待,并且光化学钝化事件显然是随机发生的蛋白质中,必然存在有独特的结构特征或独特的氨基酸序列,而在另一些蛋白质中,不同的结构特征则导致相反的结果,即非随机的光化学事件以及在酶的钝化中包含有能量的迁移<sup>(14)</sup>。

### 5.3.4 结 论

近年来,由于在核酸光化学方面的研究蓬勃兴起,使得对氨基酸和蛋白质的光化学兴趣大为逊色。然而,只有了解了核酸和蛋白质这两者的光化学,我们才能正确理解紫外线对细胞的作用机制。人们发现在细胞和病毒内蛋白质和核酸相互之间发生光化学反应,这个发现不可避免地使得在氨基酸和蛋白质的光化学反应方面的研究重又开展起来,特别是在有

其他生物分子参加的情况下研究氨基酸和蛋白质的光化学反应。

## 5.4 光化学损伤的修复<sup>[17]</sup>

### 5.4.1 引言

细胞可能具有从辐射损伤中恢复过来的能力的第一个启示是看到在细胞的处理上较小的变动(例如生长培养基、温度等等)对受照射细胞的存活能力发生明显的影响。在 1937 年, Hollaender 和 Claus 发现, 如果在琼脂培养基上接种之前把紫外线照射过的真菌孢子在水或盐溶液中保持一段时间, 就可以得到较高的存活水平。Roberts 和 Aldous 扩展了这些观察, 他们证明: 只要在接种到琼脂培养基上之前把受照射的细胞在缺乏能量来源的介质中保持不同时间, 就可以使大肠杆菌 B 的紫外线照射存活曲线形状发生相当大的改变<sup>[18]</sup> (图 5-7)。这个现象叫做液体保持的恢复 (LHR), 已经证明这种现象需要完整无损的 *uvr* 基因, 此基因是控制切除修复第一步的基因 (参阅下文)。因此, 看来把细胞保持于没有营养的介质中会提高切除修复过程的效率<sup>[19]</sup>。不像液体保持的恢复那样明瞭其分子基础的其他恢复现象已经有人作了综述<sup>[1,20]</sup>。

辐射存活曲线不同形状的意义的新解释也导出了某些细胞能够修复辐射损伤的假说。根据经典的靶理论<sup>[21]</sup>, 存活曲线的肩应该表明有多个靶子(或对靶的多次击中)。但是, 大肠杆菌的一些关系很近的突变型预料不会有数目或类型相差很多的靶, 然而它们的存活特征曲线却明显不同 (图 5-8)。抗辐射较强的菌株的存活曲线的肩被重新解释为这些细胞修复辐射损伤的能力的体现<sup>[22]</sup>。于是, 存活曲线的肩就代表着

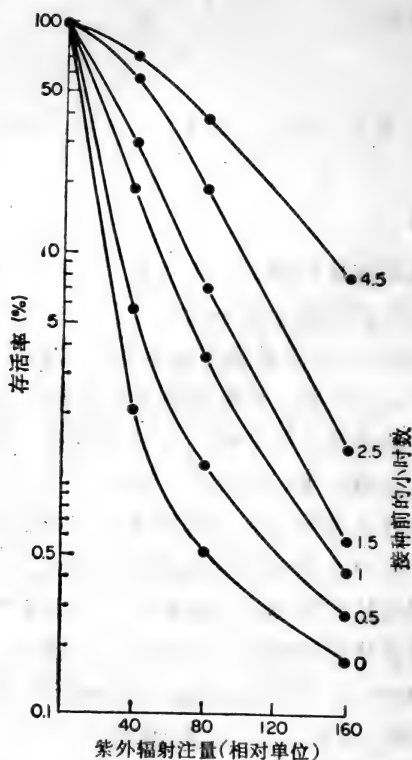


图 5-7 大肠杆菌的紫外线照射存活曲线。照射后，在接种到琼脂培养基上之前把受照射的细胞悬浮于缺少能量来源的液体介质里保持图中标的时间。显然，细胞的这种照后处理可以改变存活曲线的斜率和形状(转引自文献[18])。

细胞能够在多大剂量范围内克服产生的损伤。在存活曲线变得陡峭的较高剂量下，或者是修复系统本身可能被辐射所钝化，或者在 DNA 中的损伤数目可能超过了修复系统对付这种损伤的能力。

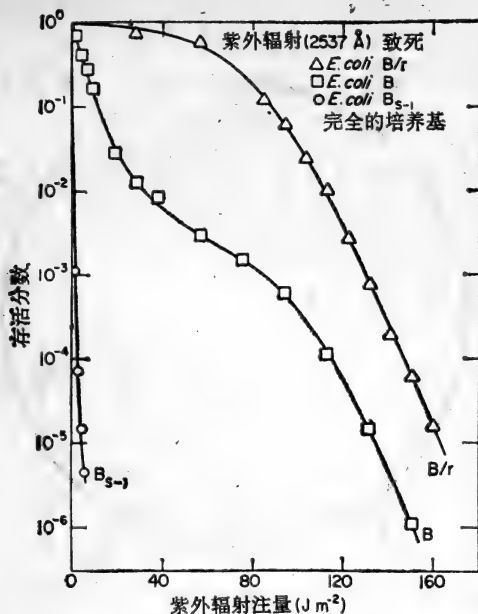


图 5-8 不同的大肠杆菌 B 的突变型的紫外线存活曲线。[转引自 R. H. Haynes, *Photochem. Photobiol.* 3, 429(1964)]

随着弄清影响细胞辐射敏感性的几个基因图(图 5-9)和几种突变型中生化缺陷的测定,人们已经弄清楚了修复辐射损伤的酶促机制的存在及其重要性。

#### 5.4.2 关于光化学损伤的修复机制

为大量资料所证明的有三种修复模型:

(1) 分子的损伤部分在原位恢复其功能状态。这可能是由于损伤自发的“衰减”为一无害的形式,例如嘧啶水合物的脱水或自由基复合产生一复原的分子(例如  $\text{R}^{\cdot} + \text{H}^{\cdot} \rightarrow \text{RH}$ );或者这可能是通过某些酶促机制来实现的,例如光复活作用。光复活是通过可见光照作为动力的环丁烷型嘧啶二聚体

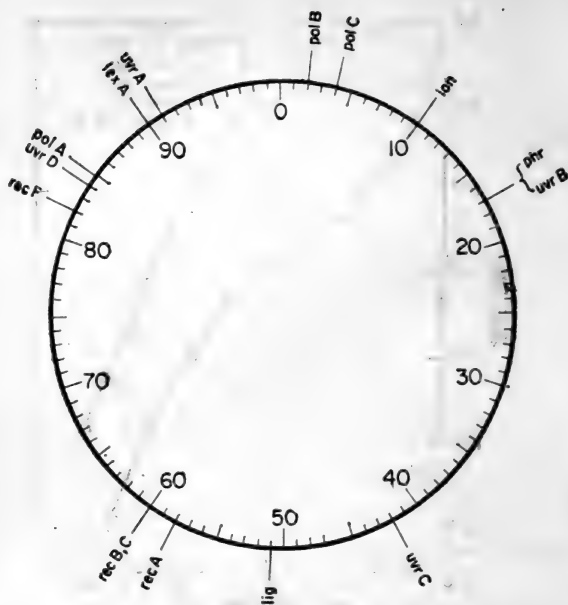


图 5-9 在大肠杆菌中影响辐射敏感性的突变(见下表)。[转引自 B. J. Bachmann, K. B. Low 和 A. L. Taylor, *Bacteriol. Rev.* **40**, 116(1976)]

突变体命名	缺少的功能
lex(exr)	复制后修复 (PRR); 切除修复(ER)
lon	有中隔形成(即形成丝状体)
phr	光复活酶
polA(res)	DNA 多聚酶 I, ER
polB	DNA 多聚酶 II, ER
polC(dnaE)	DNA 多聚酶 III, ER
recA	重组; PRR; ER
recB,C	重组; 外切酶 V; PRR; ER
recF	重组; PRR
uvrA,B	核酸内切酶; ER
uvrC	ER
uvrD	PRR; ER
lig	多聚核苷酸连接酶; ER, PRR



在原位的酶促裂解，它是在分子水平阐明的第一个修复系统<sup>[23]</sup>。

1949年Kelner观察到，如果受紫外线照射的细菌接着用很强的蓝光照射，那么其细胞的存活率可以大大增加。1960年Rupert证明了光复活酶的存在，并弄清了它的基本特性。在暗条件下，这种酶与紫外线照射的DNA结合形成一个酶-底物复合物。吸收320nm和410nm之间的光就使这个复合物激活，底物就由环丁烷型嘧啶二聚体转化为单体嘧啶，同时释放出酶。在一定的条件下，多达80%的由低注量的254nm的紫外线在细菌中引起的致死损伤可以受到光复活，这就表明了作为致死损伤的嘧啶二聚体的重要性。从最简单的活细胞支原体到人的皮肤和白血球，在很多种生物里都找到了光复活酶<sup>[24]</sup>。

(2) 去掉DNA链的损伤片段并以未损伤的核苷酸代之，从而恢复DNA的正常功能。这一机制是以通常叫做“切割和修补”的切除修复系统为基础的<sup>[1,25,26]</sup>。它是第一个发现的暗修复机制，所以叫暗修复是为了与以可见光为动力的光复活机制相区别。已经证明切除修复系统可以修复一系列辐射和化学物质引起的DNA上的结构缺陷，但是最初观察到的还是对于修复紫外线引起的环丁烷型嘧啶二聚体的一种机制。图5-10给出在切除修复中包含的可能步骤的图示说明。

在这一修复系统中第一步是损伤(或许有时是DNA螺旋的变形)的辨认，以及在靠近损伤部位的DNA链上切断(内切步骤)。然后通过DNA聚合酶的作用以DNA的另一条互补链为模板开始重新合成(修复复制)，然后把损伤切去而完成切除过程，最后当切去的那一段由未受损伤的核苷酸填满时，通过多聚核苷酸连接酶使单链中断处连接起来，于是得到修复的DNA。最近对切除修复的酶学已有综述<sup>[17,24,27]</sup>。

切除修复可以分两条途径(图5-11)。在主要途径上，

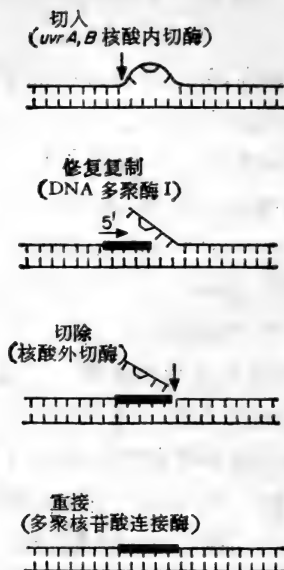


图 5-10 切除修复主要途径的一般模式。  
一个酶先辨认出损伤，这里是用环丁烷型嘧啶二聚体来表示的，然后在 DNA 链上切开一个切口。再用 DNA 的另一条互补链作为模板开始修复复制(粗线)。最后，把 DNA 的损伤部分切除，并把 DNA 链上的断口连接起来。垂直箭头表示核酸酶在损伤的 DNA 链上切开的位置，水平箭头表示修复复制的方向，复制从 DNA 的 3'OH 末端开始 [转引自 P. C. Hanawalt, *Endeavour*, 31, 83—87 (1972)]。

修复可以在缓冲液中进行并需要 DNA 聚合酶 I ( $\text{PolA}^+$ )。在缺少这种酶的情况下(即在  $\text{PolA}^-$  突变型的情况)，DNA 聚合酶 III ( $\text{PolC}^+$ ) 可部分地代替之。次要的途径(对修复损伤的数目而言)需要完善的生长培养基和若干基因产物。这条途径明显地引起突变，大概是由于错误修复所致。虽然根

据几个必需的基因产物勾画出了这两条途径,但很清楚,对于完成各个途径的修复将会需要比在图 5-11 中表示出的更多的基因产物(酶? )。例如,如果 DNA 的链断裂是作为修复的一个步骤产生的,于是为了使链重新接起来(图 5-10)就需要多聚核苷酸连接酶。对于由 X 射线照射产生的 DNA 单链断裂的修复已证明同样是这些途径<sup>[28]</sup>。

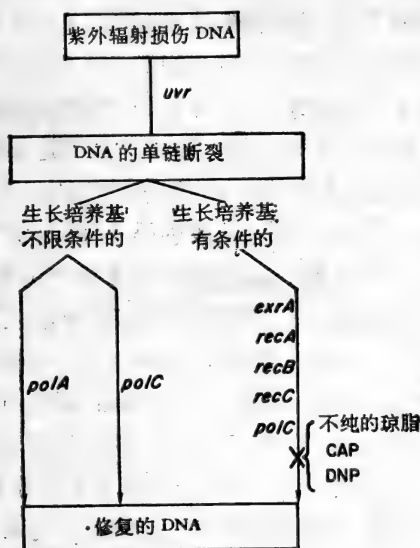


图 5-11 大肠杆菌中切除修复的不同途径之遗传和生理控制。虽然仅仅是根据必需的几个基因产物来勾画这些途径,但是为完成每一途径的修复所需的基因产物显然要比图上表示的多得多。在图 5-9 中定义过各种突变型。氯霉素(CAP)、二硝基苯酚(DNP)和混合琼脂培养基抑制与生长培养基有关的途径[转引自 D. A. Youngs, E. Van der Schueren 和 K. C. Smith, *J. Bacteriol.* **117**, 717—725 (1974)]。

哺乳动物细胞内切除修复的研究使我们看到,致癌作用和 DNA 的修复缺陷之间有明显的联系<sup>[29]</sup>,人们发现从患有遗传着色性干皮病患者身上取下的成纤维细胞在紫外线照射后

修复复制的水平非常低。有人认为这种切除修复上的缺陷可能与得这种病的患者在受到阳光照射时就会造成引起致命的皮肤癌有关系。最近有人报道,还有一些着色性干皮病的患者(所谓“XP 变态体”),他们的皮肤细胞具有正常水平的切除修复,但在复制后修复上稍有缺欠(复制后修复的定义见下文)。(参阅文献[17],第 617 页)。

(3) 其损伤虽非直接被修复,但是可以忽略或者绕过,丢失的遗传信息可以由细胞内多余的信息去填补<sup>[17,19,25]</sup>。多方面的证据表明,修复的切除模型并不是细胞能在暗条件下修复其 DNA 辐射损伤的唯一机制。第一个证据是,既不能切除修复(uvr)又不能遗传重组(rec)的细菌细胞比只带有其中之一种突变的细胞对紫外线致死要敏感得多(图 5-12)。这说明在遗传重组中的某些步骤在辐射损伤的修复中可能是重要的。(在遗传重组时,把取自“父亲”细菌的 DNA 注入“母亲”细菌,于是给体的 DNA 与受体的 DNA 结合,结果是子代细胞包含有来自双亲的遗传信息。)第二个证据是,当把 uvr 细胞接种在最低限度的培养基上时,它的活力的恢复比种在较完全培养基上的情况要多(即最低限度培养基恢复),这个事实表明,缺乏切除作用的细胞仍然能修复辐射损伤。为了表现出最低限度培养基恢复,细胞必须是 rec<sup>+</sup>型的。第三个证据是,有人已经证明,与早期资料的解释相反,像嘧啶二聚体这样的光产物不会永久地阻塞缺乏切除修复方式的细胞中的 DNA 合成。第四个证据是,大肠杆菌 K12 细胞在紫外线照射之后立即合成的 DNA,在碱性蔗糖梯度条件下分析时有碎的片段。在缺乏切除修复的细胞中,重新合成的 DNA 的平均长度近似等于亲代 DNA 链上嘧啶二聚体之间的距离。但是在细胞进一步培养以后,这些碎的片段消失了,这时合成的 DNA 的长度近似等于未照射的对照细胞的 DNA 的分子大小。这就表明,复

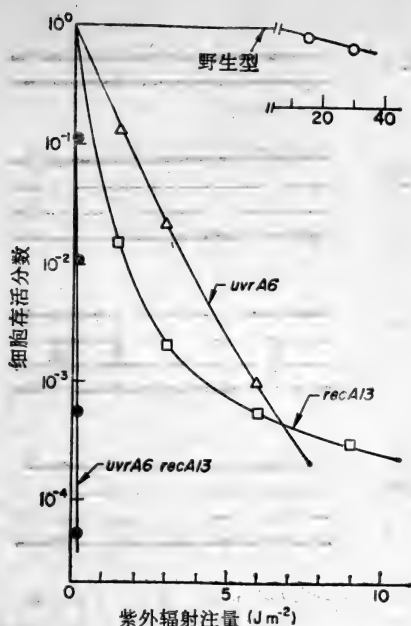


图 5-12 大肠杆菌 K12 突变株的紫外线存活曲线。这些突变型已在图 5-9 中定义过了 [转引自 P. Howard-Flander 和 R.P. Boyce, *Radiat. Res. Suppl.* 6, 156 (1966)]。

制后修复方式看来是通过在遗传重组中涉及到的某些酶为中间媒介。图 5-13 中图示了这一过程。

现在可以把复制后修复分为几个途径(图 5-14)。在 *recA* 突变型内不填充重新合成的子代 DNA 链上的间隙。*recB*、*exrA* (*lexA*) 和 *uvrD* 菌株都只是部分地缺乏 (和增加) 它们修复间隙的能力。氯霉素 (一种蛋白质合成抑制剂) 部分地阻塞间隙的填补, 但是, 如果细胞是 *exrA* (*lexA*)、*uvrD* 或 *recB* 突变型, 氯霉素就不能阻塞间隙的填补, 这说明除了它们独立的功能表现之外, 还必然有需要所有这三种基因产物共同作用的另一种途径。已经证明 *recF* 突变在复制后修复中的作用是

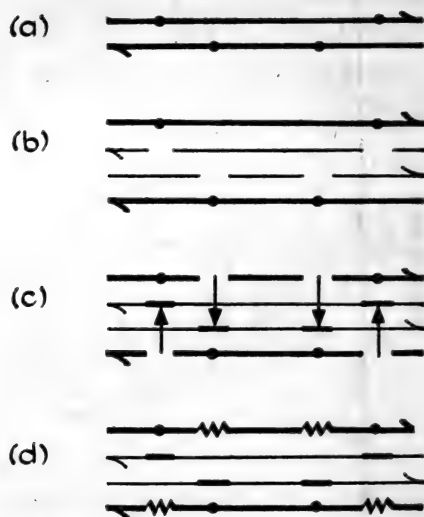


图 5-13 紫外线损伤的 DNA 复制后修复的模式。

(a) 圆点表示在 DNA 两条链上所产生的光化学损伤；  
 (b) DNA 合成越过母体链中的损伤部位进行，在子代链上留下间隙；  
 (c) 通过重组过程用母体链上的物质把子代链中的间隙填满(取决于功能基因 *recA*)；  
 (d) 通过修复复制把母体链上的间隙修复。读者要小心的是，步骤 (c) 和 (d) 是高度设想性的，当有新的资料时，它们可能要加以修改(转引自文献 [19])。

与 *recB* 无关的；是否与 *cxrA*(*lexA*) 和 *uvrD* 无关，至今仍未确定。除了在图 5-14 中表示出的基因产物之外，为了要完成经由这些途径的修复，无疑将需要核酸酶、多聚酶、连接酶等等的作用。这些途径的专一性尚待阐明。

当我们以在一定注量的紫外线照射之后存活的每个细胞的突变数作图时，*uvrA* 和 *uvrB* 菌株看来要比野生型细胞更易突变。这样我们就可以认为，复制后修复(显然在 *uvrA*、*uvrB* 菌株中只保留有暗修复型)由于错误修复而导致突变。支持这一观点的观测结果是，不能进行复制后修复的 *recA* 和 *cxrA*

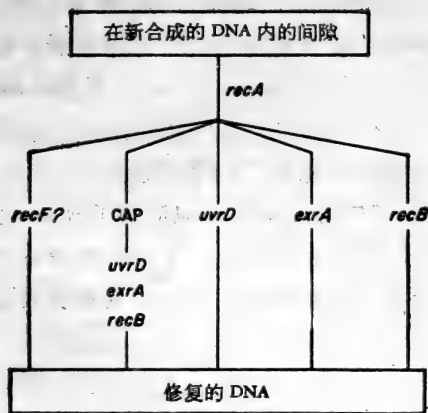


图 5-14 大肠杆菌中复制后修复的不同途径的基因控制。虽然这些途径是在只有几种必需的基因产物的基础上勾画出来的,但很清楚,要完成各途径上的修复将会需要比所表示出的数目多得多的基因产物。在图 5-9 中已定义过这些突变型。照后用氯霉素(CAP)处理抑制可能由于错误修复而产生突变的复制后修复的次要途径[引自 D. A. Youngs 和 K. C. Smith, *J. Bacteriol.*, **125**, 102—110 (1976)]。

(lexA)菌株不能由紫外线或某些化学诱变剂引起进一步突变。

### 5.4.3 结论

我们不能不为细胞所具有的修复途径的多样和精巧所折服。一个系统能够在非生长条件下修复母链上的损伤,而另一个系统则去修复子链上的间隙,这种修复只能在完备的培养基条件下出现。细胞的相当大百分数的能量要消耗在酶的合成上,以便修复和维持其 DNA 内遗传密码的完整性。但是有证据表明,这些修复系统不只是为修复对 DNA 的辐射或化学损伤才设立的,而看来是在细胞的日常生活中必备的

功能。这一结论是建立在这样的观察结果上的,虽然某些有修复缺陷的突变型在无辐射条件下正常生长,但是缺少两个修复系统的突变型(例如 *PolA recA*)是不能生存的。因此,正常的生长过程可以在 DNA 上产生断裂或其他损伤,而为了维持其生活能力就必须把它们修复起来。

DNA 修复过程的发现极大地推动了分子生物学、遗传学、癌生物学以及衰老的研究。DNA 修复的发现和阐明可算是紫外光生物学家和辐射生物学家对科学发展所做出的最重要的贡献。

## 5.5 致突<sup>[17,30-34]</sup>

紫外线是一个很有效的致突因素。在低剂量紫外线情况下,细菌的突变频率可能会增加到自然突变水平的  $10^3$  到  $10^5$  倍,而在高剂量紫外线情况下,几乎所有存活下来的细胞都可能是突变型的。没有什么可奇怪的,在细菌中紫外线引起突变时的作用光谱很像核酸(DNA)的吸收光谱。因此,为了了解致突的分子基础,我们就必须从复制和修复两方面来了解 DNA 的生物化学。

### 5.5.1 DNA上导致突变的变化

第一种类型的变化是一种碱基对被另外一种碱基对取代,这种取代可能有两种:换同型碱基的取代和换异型碱基的取代。在换同型碱基的情况下,在一个 DNA 链上的某一嘌呤碱基由另一种嘌呤取代(如  $G \rightarrow A$ ),或某一嘧啶由另一种嘧啶所取代(如  $C \rightarrow T$ )。在换异型碱基的情况下,某一嘌呤由某一嘧啶所取代,或者某一嘧啶被某一嘌呤取代[即  $(G \text{ 或 } A) \rightarrow (C \text{ 或 } T)$ ]。



第二种类型的致突变是碱基对的缺失或插入，因而产生移码突变。加进或去掉一个碱基对将会改变合成蛋白质的遗传密码的连续性，其结果或是由于无意义密码子而使多肽链终止（无意义密码子即不为氨基酸编码的核苷酸三联体<sup>[33]</sup>），或是在酶中插入一个不正确的氨基酸，从而使其钝化（误义）。

### 5.5.2 致突的分子机制

在产生突变时存在两种一般的分子机制。一个存活下来的细胞可以因为一个未修复的 DNA 损伤在 DNA 复制期间产生错误而发生突变。我们已经讨论过（5.2.3 节），胞嘧啶的光水合物在体外的酶系统中译码为腺嘌呤而不是鸟嘌呤。然而，由于紫外线不会引起 *recA* 和 *lexA* (*exrA*) 菌株突变（见下文），虽然在这些菌株中可以通过用某些化学药品处理而引起突变，但这样直接导致突变的光化学损伤在活体内谅必少见。

目前在若干实验室正积极研究之中的第二种机制是基于这样一种假说，即一种诱发的有差错的修复系统在恢复一个可存活的 DNA 结构的过程中改变了 DNA 的碱基顺序。这个概念部分地是根据如下的观察结果，大肠杆菌的某些修复能力有缺陷的菌株 [即 *recA* 和 *lexA* (*exrA*)] 不会由于紫外线而进一步突变，这些菌株也缺少一些别的由辐射诱发的功能，例如形成丝状体和引入  $\lambda$  噬菌体的功能<sup>[17,30]</sup>。

人们认为导致突变的有差错的修复是经由两个基本途径实现的。在一种过程中，突变看来是通过由 *recA* 和 *lexA* (*exrA*) 控制的次要修复系统错误地修复了在切除嘧啶二聚体和其他光产物之后留在 DNA 上的间隙所引起的。另一突变过程看来和 DNA 上的光产物直到复制时仍未切除有关，在这种情况下复制时，由于有差错地修复新合成的对应于亲代 DNA 链

的损伤区域的子代 DNA 链内所形成的间隙就产生了突变[即复制后修复也受 *recA* 和 *lex(exrA)* 基因的控制]。

突变的产额对紫外线注量的响应曲线非常符合注量平方的关系,人们在解释这种关系时提出下列看法:为了产生一个突变需要在细胞里产生两个损伤,其中之一可能用来诱发有差错的修复系统<sup>[17,30]</sup>。

### 5.5.3 研究致突所用的方法

因细菌生长迅速而且容易大量获得,因而它是研究致突的常用材料。所研究的突变类型是那些可用简便的方法进行检验的突变型。因此大多数研究是观察细菌所获得的抗噬菌体或抗抗菌素致死的能力和观察向原质营养型的逆转(即,营养缺陷型的细菌为了其生长可能需某种氨基酸,而原质营养型细菌则不需要)。

向原质营养型逆转是最常用的检验方法,这是因为用它不难探测到很低的突变率,并可以用同样的培养基(含 $\sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$  所需氨基酸的部分浓集培养基)计数突变和存活。

测定存活时接种的密度很低,这时营养缺陷型形成小的但是可以看得见的菌落;为了计数突变,接种的细胞密度很高,这时营养缺陷型的细胞形成了一块有界限的细胞“草地”,以这块“草地”为背景,原质营养型突变体则形成大的菌落。为了计数天然存在的突变(即无紫外线照射情况下)的频率,就必须把细胞接种在完全没有所需氨基酸的培养基里。

带有一种新的属于原质营养型突变的营养缺陷型细胞在表现型上将仍然是营养缺陷型的,如果它在接种到欠佳的培养基上之前不能首先有机会合成出某种酶,它就不能在欠佳的培养基上形成菌落。这就解释了上面所说的为什么需要那种部分浓集的培养基的原因。

测定突变的这一方法是根据这样的假定,即在细胞稀疏的培养板上(为计数存活)和在细胞密集的培养板上(为计数突变)细胞的存活率是一样的。对某些细胞株来说,特别是对那些受致突因素作用后形成丝状体的细胞株,情况并非如此。形成丝状体的细胞在密集的培养板上可以表现出 100% 的存活(“邻居恢复”),而在稀疏的培养板上只有 5% 的存活率。这样一种反应对“表观”突变产额将有很大的影响。

在辐射生物学中有一个经典的而又悬而未决的问题,为了比较两个对辐射致死有不同敏感性的细胞株的某一辐射效应,是在相同的辐射注量下进行比较好呢,还是在相同的存活率下进行比较好?当我们想要比较辐射敏感的和辐射不敏感的菌株的突变频率时,也同样存在这一问题。

#### 5.5.4 校正基因的突变

DNA 上一些特异基因内的变化导致原发突变,当一个突变型细菌由于在不同部位或位点上的另一个突变而又逆转为野生型时,这第二个突变就叫做第一个突变的校正基因。例如,如果色氨酸合成酶的 174 位上的酪氨酸被半胱氨酸取代,那么这个酶就是无活性的;但是,如果在 210 位上的甘氨酸代之以谷氨酸,酶的活性就又恢复了,这是基因内校正的一个例子。基因之间校正的例子是这样一种情况,次要成分的 tRNA (即有两种型式的 tRNA, 主要型式的 tRNA 和次要型式的 tRNA, 它们都翻译同一种氨基酸)发生了突变,结果它的反密码子就翻译了一个它不携带的不同的氨基酸<sup>[33]</sup>,于是,在色氨酸合成酶中,210 位甘氨酸由精氨酸取代产生一无活性的酶,但如果一个突变的 tRNA 嵌入甘氨酸而不是精氨酸,结果得到一个有活性的酶。这种类型校正的效率是低的,在有校正基因存在的情况下,既生成有活性又生成无活性形式的酶。

### 5.5.5 对温度敏感的突变型

最近,分离出了若干对温度敏感的突变型,这在 DNA 修复的研究上是很有价值的(例如, pol C 缺少 DNA 聚合酶 III; lig<sub>ts</sub> 缺少多聚核苷酸连接酶)。在一般随意条件下(即在 ~30℃ 时)它们都是和野生型有同样行为的突变型,而在限制条件下(即在如 42℃ 那样较高的温度下)就是突变型。如果一个细胞完全没有 DNA 聚合酶 III, 那它就不可能复制其 DNA, 这种突变将是致死的。因此,把 polC 突变叫做有条件的致死突变,即它有赖于其生长时的温度条件。温度敏感性寓于突变型的酶分子内,显然在较高的温度下酶分子的构型将会改变(变性?)到失去活性的程度。

### 5.5.6 结论

近来发现的致突与 DNA 修复的关系重新激起人们对致突问题的普遍兴趣,并将为该领域的迅速进展提供基础。

另一个刺激因素是近来发现的致癌和致突之间的关系。现在知道,许多致癌剂必须首先经过代谢才能形成最终的致癌物,已经证明几乎所有的最终致癌物都是致突剂<sup>[36]</sup>。因此,如果我们能够了解致突的基础,那么我们会更好地懂得致癌的分子基础。

## 5.6 实 验

### 5.6.1 核酸的光化学

水合物的形成: 测定尿苷酸 (30 μg/ml) 的吸收光谱 (200—300nm)。在 254nm (15WGE 灭菌灯) 于石英池内照射, 然后观察在 260nm 处的吸收随时间的消失。当 260nm 处的吸收

小于约 0.2 时, 测定全吸收光谱。用浓盐酸 ( $\sim 0.1\text{ml}$ ) 调节照射溶液使之到  $\sim \text{pH}1$ , 盖好, 并置于室温下 24 小时, 混合, 并测定吸收光谱 [R. L. Sinsheimer, *Radiat. Res.* **1**, 505—513 (1954)]。

胸腺嘧啶二聚体的形成: 测定胸腺嘧啶 ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的吸收谱 ( $230\text{—}300\text{nm}$ )。在几个 10ml 的烧杯中每个都加入  $250\mu\text{l}$  的胸腺嘧啶溶液 ( $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 冷冻并在冷冻器中照射 ( $254\text{nm}$ ) (你必须在室温下打开光源, 然后放入冷冻器)。在不同的时间取样, 熔化, 并定量地转移到 5ml 的容量瓶中, 测定在  $260\text{nm}$  的吸收; 当吸收率降低到 0.3 左右时, 测定样品的吸收谱以证明胸腺嘧啶的特征吸收谱的丧失。然后在室温下照射此溶液, 并观察在  $260\text{nm}$  处的吸收随时间的恢复。当吸收增长到最大值时, 测定全吸收谱来证实胸腺嘧啶的形成。(在冰冻期间, 胸腺嘧啶发生平行排列, 这时二聚体的形成和裂解之间的光化学平衡有利于二聚体的形成, 然而在溶液中, 重新照射又使二聚体裂解, 然后其单体扩散开去而不能再二聚化。)

胸腺嘧啶二聚体(在冷冻时照射后)可以进行层析并与残留的胸腺嘧啶分离 [K.C. Smith, *Photochem. Photobiol.*, **2**, 503—517 (1963)]。虽然使用放射性标记的胸腺嘧啶时可以大大便利于这些研究, 但是可以把层析谱裁成  $1\text{cm}$  的小条 (横向地), 在水中洗脱, 并在  $260\text{nm}$  检验其吸收。可以把怀疑含有胸腺嘧啶二聚体的溶液再如上所说的进行光照, 以使二聚体裂解, 并得到在  $260\text{nm}$  处有吸收的胸腺嘧啶。

## 5.6.2 紫外存活曲线和光复活

存活率: 可以从耶鲁大学医学院人类遗传学系大肠杆菌遗传材料中心获取菌株 AB 1157 (野生型) AB 1186 (*uvrA* 6), AB 2463 (*recA* 13), 及 AB 2480 (*uvrA* 6 *recA* 13), 这个实验需

要一些微生物技术方面的专长,并需要一个在 254nm 处刻度过的紫外灯。可以用  $10^{-4}M$  的尿苷酸 (UMP) 作为化学光度计进行粗略的刻度(参阅参考文献 8 第 193 页),紫外线注量率( $J/m^2s$ )等于

$$\frac{\left[ \frac{A_i - A_f}{A_i} \right] \left[ \frac{\text{mol(UMP)}}{\text{ml}} \right] \left[ \text{ml(UMP)} \right] \left[ \frac{11.9 \times 10^8 J E^{-1}}{2537(\text{\AA})} \right]}{[1.9 \times 10^{-2} \text{mol} E^{-1}(\phi)] [( \text{样品表面积}) m^2] [( \text{照射时间}) \text{秒}]}$$

式中  $A_i$  和  $A_f$  是 UMP 在 260nm 处的初始和最终的吸收。

按如下操作可能得到接近于图 5-12 中的存活曲线: 在酵母提取的营养汁中过夜生长之后收集细胞,并在缓冲液中稀释 1:10 以给出  $\sim 1 \times 10^8$  细胞/ml。在 10cm 的佩特里氏培养皿(Petric dish)放入 10ml 左右细胞,放在摇床上用不同注量的紫外线照射(8WGE 灭菌灯放在细胞上方约 47cm 处,给出约  $1J/m^2s$  的注量率),适当稀释(根据图 5-12 来估算),使 10cm 佩特里氏培养皿平板上铺样 0.1ml 时,每块平板得到大约 200 个存活细胞。在生长 24—48 小时之后就可以计数菌落了。

光复活: 在每个平板上铺样约  $2 \times 10^6$  个 AB2480(*uvrA 6 recA13*)菌株的细胞。立即对 4 个平板进行  $0.4J/m^2$  的紫外线照射(存活率约为  $7 \times 10^{-6}$ )。然后在 3 个紫外线照射过的平板上面和 1 个未经紫外线照射过的平板上面(它们都没有塑料盖)放上装满水的硬质玻璃佩特里氏培养皿盖,作为紫外线和红外线的过滤器。在平板琼脂表面的上方 5cm 处放上两个日光型荧光灯泡,紫外线照射过的平板照射 1、5 及 10 分钟,未经紫外线照射过的平板照射 10 分钟。让所有平板在  $37^\circ C$  培养 24—48 小时,然后测定光复活作用对存活率的影响。

(郭绳武译 沈 恂校)

## 第6章 环境光生物学

Howard H. Seliger

(约翰·霍普金斯大学麦克拉姆-普拉特研究所和生物系)

6.1	序言 .....	175
6.2	太阳是维持地球上生命的自由能的来源 .....	176
6.2.1	引起进化的光谱强度 .....	177
6.2.2	臭氧、核酸和蛋白质紫外吸收的巧合 .....	179
6.2.3	对臭氧层的可能扰动 .....	180
6.2.4	紫外线增强可能带来的生物学后果 .....	185
6.3	水生光生物学 .....	190
6.3.1	河口的生态系统 .....	192
6.3.2	水下阳光的谱分布 .....	195
6.3.3	双鞭甲藻的积聚机制 .....	197
6.3.4	浮游植物的现有产量 .....	202
6.3.5	光和光透区的填充 .....	207
6.3.6	结论 .....	209
6.4	实验 .....	210

### 6.1 序 言

在光生物学的许多领域,人们的兴趣往往集中在光化学反应的机制上,在光合膜和光敏色素这些比较复杂的系统中,还必须考虑它们的结构和生化调节。环境光生物学的显著特点首先在于它把光生物学的机制统一在一个完整的生物身

上，其次是把这些机制统一在组成生态系统或其中一部分的那些生物之间的关系上。在水生生态系统中，环境光生物学关心的也许是这样一个问题：由于冲到河流下游河口的泥沙量增加，水的混浊度加大了，这就可能因为缺少充足的阳光而使有根系的水生植物绝迹。在这种情况下，光合作用的光生物学过程没有改变，但是因为没有达到某一特定的阈值，植物将会死亡或不能繁殖，这个阈值指的是对于光合作用的光强补偿点，它是这样一个水下的光强，在这个光强下，水生植物从太阳光获得的自由能等于植物为保持其生命（概括为一般所说的呼吸）所消耗的能量。水生植物的死亡又可能使那些以这些植物为食物或栖身之所的高营养水平的生物（鱼或蟹）的数目减少。

再看第二个例子，供给一个水生生态系统的养分如果增加（营养充足），它将往往造成浮游植物种类分布的改变。由于捕食或其它行为方面的特征对体形大小提出的要求，浮游动物或一些食草水生动物因此也可能改变它们的种类分布，这最终可能影响捕食这些浮游动物的鱼群和捕食小鱼的大鱼的种类分布。

因此，环境光生物学是一个命名非常准确的领域，它要检验一些光生物学的过程和它们与整个生态系统的关系。

## 6.2 太阳是维持地球上生命的自由能的来源

自从我们的太阳系形成以来，一直以每秒钟落在地球表面  $2\text{kg}$  阳光的速率向地球上的所有生命提供着自由能。射在外层大气层上的太阳常数是  $2.0\text{cal}/\text{cm}^2\text{min}$ ，它相当于每年向地球递交  $5.61 \times 10^{24}\text{J}$  的能量，按质能等效单位计，这个能量等于每年 68600 吨或  $2\text{kg}/\text{s}$ 。这样射来的阳光的光谱强度分



布表示在图 6-1 上,曲线 1 是波长的函数,其波长范围从紫外(UV)区内的 200nm 到红外区里的 1800nm,纵轴的单位是光子/秒  $\text{cm}^2\text{nm}$ ,由于大气层中的臭氧对紫外和可见光的吸收及水蒸气对红光和红外线的吸收,光谱分布从曲线 1 变成曲线 2 所示的形状,曲线 2 是目前射在地球表面上的阳光的光谱强度。290nm 是穿过大气层到达地球表面的阳光的短波极限,在这个波长上,由于大气中臭氧层的减弱和分子的散射,光谱强度减弱了  $2 \times 10^6$  倍。在图 6-1 的曲线 3 上,以对数单位画出了地球表面阳光里的紫外辐照度,那条与它重叠的曲线 d 表示在同样的波长范围内紫外线引起皮肤红斑的相对作用光谱,这个波长区域我们在后面还将涉及。

### 6.2.1 引起进化的光谱强度

图 6-1 的曲线 4 和 5 表示两种不同类型的水对水下阳光光谱强度的吸收效应;曲线 4 是在清澈“蓝色的”热带海洋水中 10m 深处  $2\pi$  立体角内向下射的光谱辐照度<sup>[2]</sup>,而曲线 5 是在养分丰富的湖水中仅仅 1m 深处向下射的光谱辐照度。

一般认为原始的大气层里基本上没有氧和它的光解产物,包括没有臭氧。因此人们假定生命是在一些深度大于 10 m 的浅池塘的底部起源和进化的,这些池塘的水层厚度足以减弱能引起生命死亡的波长在 300nm 以下的紫外线,在参考文献 8 中可以找到对这一观点比较全面的讨论和文献资料。但也可能是另一种情况:由于光固定过程(photostationary process)的结果,由紫外线合成出来的有机和无机化合物的原始“汤”提供了一个起保护作用的紫外吸收层,因此比 10m 浅的养分丰富的泥塘反而有利于一些原始生命形式的进化。在实验室里复现紫外线引起的原始生物分子合成的困难之一在

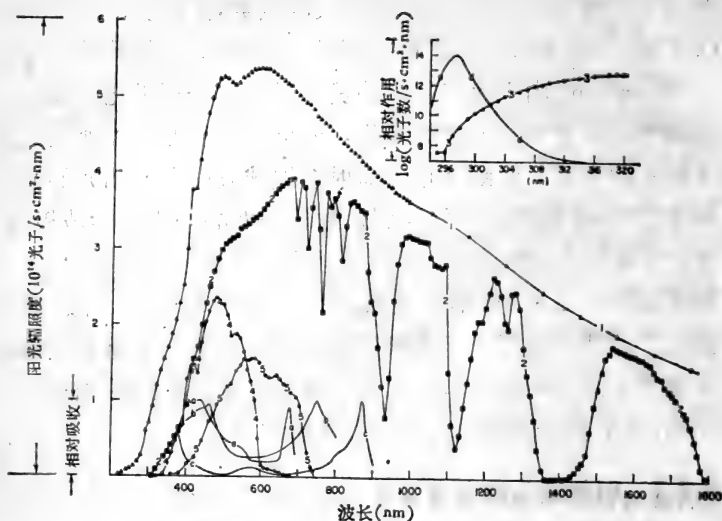


图 6-1 以  $10^{14}$  光子/cm<sup>2</sup>·nm 为单位的太阳光的光谱辐照度。曲线 1: 在地球大气层外 55 公里距离处太阳辐照度的分布, 数据是根据参考文献 1 中的表 813 重新计算的; 曲线 2: 按对太阳的天顶角为  $60^\circ$  计算的地球表面的阳光辐照度的分布, 天顶角  $60^\circ$  相当于两个大气层(数据是根据参考文献 1 中的表 815 重新计算的); 曲线 3: 在地球表面引起皮肤红斑的作用光谱的波长区域内太阳光的辐照度的对数(数据根据参考文献 1 中的表 815 重新计算); 曲线 4: Islas Tres Marias 附近蓝色清澈的热带海水中 10m 深处向下射的辐照度的分布(引自参考文献 2, 360nm 以下的的数据是根据参考文献 1 中表 559 和表 563 并参考紫外辐射分别在水和大气中的透射率计算出来的, 而入射的光谱辐照度则取自同一文献的表 813); 曲线 5: 在养分丰富的淡水湖中 1m 深处向下射的辐照度的分布(引自参考文献 2)。

相对吸收率或作用光谱。曲线 a: 褐藻 *Gonyaulax polyedra* 的相对吸收率(数据根据参考文献 3 重新计算); 曲线 b: 绿色光合细菌 *Chlorobium* sp. 的相对吸收率(引自参考文献 4); 曲线 c: 紫色光合细菌 *Rhodospirillum spheroides* 的相对吸收率(取自文献 5); 曲线 d: 紫外线诱发皮肤红斑的作用光谱(引自参考文献 6 和 7)。

于石英照射容器的内壁上沉积了一层强烈吸收紫外线的合成分子的膜, 与其说是比较均匀的“汤”, 不如说这层原始的“外衣”更能产生图 6-1 上曲线 4 和 5 所表示的辐照度的谱分布。

在 10m 的深度,即使是在最清洁的海水里,与地表辐照度的曲线 2 相比,射进来的阳光强度在 620nm 以上已被减弱到可以忽略的水平。在养分丰富的浅水中,大约 500nm 以下就出现强烈的短波长吸收,这种水域只对含有黄光吸收色素(藻红蛋白)和红光吸收色素(叶绿素)的生物适合。

多边膝沟藻 *Gonyaulax polyedia* 的相对吸收光谱表示在图 6-1 的曲线 a 上,造成光谱辐照度曲线 5 的主要吸收位于蓝区和 700nm 以下的红区,这两个区域是光合作用色素主要吸收的谱区。

硫磺绿色的光合细菌(绿杆菌 *Chlorobium*)和蓝绿色光合细菌(红螺菌 *Rhodospirillum*)的相对吸收光谱分别以图 6-1 上的曲线 b 和曲线 c 给出,由曲线 c 可以看出,由于水的红外吸收,红螺菌在较深的水里不能很好地生长。因此,如果光合细菌出现在进化过程的早期(氧进化之前),则它们势必限制在某种原始的合成分子层的下面,这种分子层厚到足以吸收掉能致死的紫外线而又薄到足以透过 900nm 的光。如果光合细菌出现较晚(绿色植物出现以后)的话,那么它们就应该生长在能够接收直到 900nm 波长光的营养丰富的缺氧地表水中。

### 6.2.2 臭氧、核酸和蛋白质紫外吸收的巧合

由大气中有效厚度 3mm 的臭氧层造成的紫外吸收谱和没有氧气的原始地球表面上的阳光辐照度表示在图 6-2 上,在核酸和蛋白质吸收谱带的最大值 260nm 和 278nm 处,射到地面的阳光被分别减弱了  $10^{40}$  和  $10^{17}$  倍。培养的哺乳动物细胞在接受了注量低到  $10\text{J}/\text{m}^2$  的水银杀菌灯的紫外线 (254 nm) 后,可以观察到明显的致死,这样一个注量的紫外线相当于  $1.3 \times 10^{15}$  光子/ $\text{cm}^2$ ,造成这种致死的作用光谱在 270nm

附近有一个较宽的峰,其半宽度为 50nm。根据图 6-2 有可能估计出,在没有臭氧的情况下,这个作用光谱内总的辐照度将是  $1.3 \times 10^{15}$  光子/cm<sup>2</sup>s, 因此,即使照射阳光 1 秒钟,这个数值也无疑是致死的照射率。

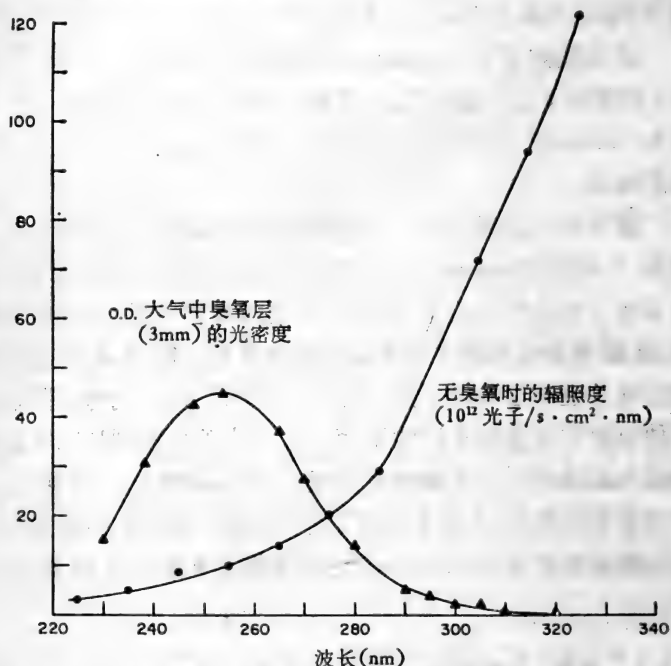


图 6-2 在没有臭氧对紫外线吸收时地球表面的太阳辐照度(●),和现在大气中 0.3 大气压-厘米的臭氧层的光密度(▲)(引自参考文献 8)。

图 6-2 表明了臭氧吸收谱带巧合的位置,它说明大气中 3mm 有效厚度的臭氧层足以能允许简单的生命形式出现在地表水中,然后再出现在陆地上。

### 6.2.3 对臭氧层的可能扰动

从臭氧层对地面生物的重要性来看,有必要了解产生这

个很薄的保护层的化学和光化学机制。臭氧层在温带地区平均为 0.3 大气压-厘米,在赤道和北纬 20 度之间,臭氧层的厚度是 0.25 大气压-厘米,在北纬 60 度以上它可能厚到 0.48 大气压-厘米,在瑞士的达弗斯(Davos)(海拔 1575m)观察到的臭氧层的厚度在 0.197—0.373 大气压-厘米范围内,这种变化引起了紫外区(特别是在产生皮肤红斑的作用光谱的峰值波长 290—300nm 范围内)光谱强度的很大变化(图 6-1 的曲线 d)。

臭氧的吸收是指数式的,任一波长处的光密度(O.D.)由下式给出:

$$\text{O.D.}_\lambda = \log \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = \epsilon_\lambda cd \quad (6-1)$$

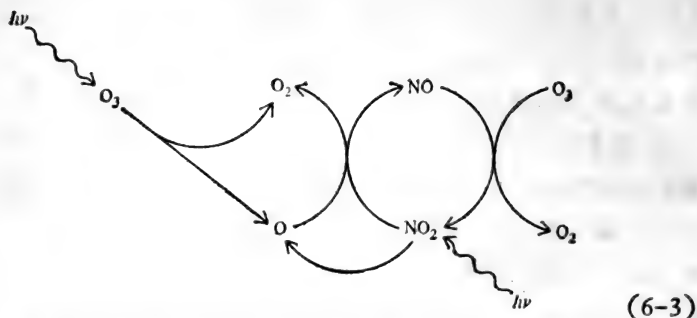
式中  $\epsilon_\lambda$  是波长  $\lambda$  处的以 10 为底的消光系数,其单位是 (大气压-厘米) $^{-1}$ ,  $cd$  是以大气压-厘米为单位的臭氧层的厚度。

由这个关系可以看出:

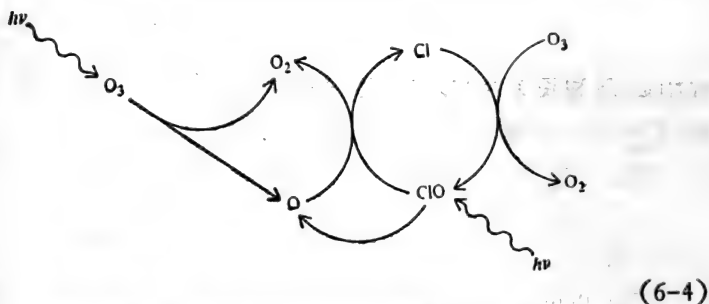
$$\frac{dI_\lambda}{I_\lambda} = 2.30 \text{O.D.}_\lambda \frac{d(cd)}{(cd)} \quad (6-2)$$

在 290nm 处,  $\text{O.D.}_\lambda = 5$ , 臭氧层减少 10% 就会使地表辐照度在 290nm 处增加 115%; 在 300nm 处增加 46%, 由(6-2)式和图 6-1 的曲线 d 可以清楚地看到, 大气中臭氧层的厚度略微减少一点, 就可能使皮肤红斑区域里紫外线的强度大大增加。

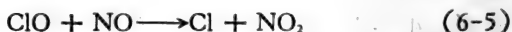
直到最近人们还以为空气污染的主要后果是增加了大气的混浊, 说的更具体一点就是增加了对光谱区里小于 310nm 的紫外线的吸收。但是, 有几种形式的空气污染可以引起臭氧层减小, 从而可能使皮肤红斑作用光谱区里的紫外线强度增大, 示意图(6-3)给出了 NO 破坏臭氧的催化循环, 它包含着  $\text{NO}_2$  和  $\text{O}_3$  的光分解:



第二种甚至是更有效的催化循环涉及到游离的氯原子<sup>[11]</sup>，一组与 NO 循环类似的反应由示意图(6-4)给出：



在 NO 和 ClO 两者同时存在的情况下，我们还可能有从 ClO 到 Cl 的转换：

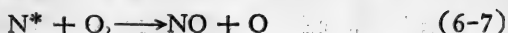


在自然界中：①由土壤中的细菌产生的一氧化二氮 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) 慢慢地扩散到同温层里，它们在那里与光解产生的氧原子反应生成一氧化氮：



式中  $\text{O}^*$  是氧原子的激发态，②氮可以被羟自由基 ( $\text{OH}^\cdot$ ) 氧化或被光解生成自由基  $\text{NH}_2^\cdot$ ， $\text{NH}_2^\cdot$  又可以进一步反应形成一氧化氮；③宇宙射线的电离可以产生激发态氮原子  $\text{N}^*$ ， $\text{N}^*$

又和分子氧反应生成 $\text{NO} + \text{O}$ :



$\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_3$  的氧化是同温层里天然一氧化氮的主要来源,它们控制着  $\text{O}_3$  的稳态浓度。宇宙射线的电离在同温层里平均产生  $10^7 \text{NO}$  分子/ $\text{cm}^2\text{s}$ ,而由其它天然来源提供给同温层的一氧化氮分子的总数估计是  $(3-30) \times 10^7$  分子/ $\text{cm}^2\text{s}^{[12]}$ 。有人提出,如果不是由于生物的活动所产生的一氧化氮,臭氧层将可能是它正常厚度的两倍。然而在使用这些数字时应该小心,现在的臭氧层是生物活动(光合作用)所释放的氧的结果,这种生物活动已经克服了 Urey 提出的原始大气层中  $\text{O}_2$  浓度的自身调节机制<sup>[13]</sup>。

### 6.2.3.1 同温层飞行产生的一氧化氮

一个同温层扩散模型现在包含着 12 个光解速率方程和 65 个与产生臭氧及其被  $\text{NO}$  催化分解有关的反应的化学速率方程,其中的  $\text{NO}$  是由超音速运输机的高空飞行引进同温层的<sup>[14]</sup>,来源于天然生成的  $\text{N}_2\text{O}$  的  $\text{NO}$  大约是  $10^8$  分子/ $\text{cm}^2\text{s}$ 。在 28 公里以上的高空存在着一个稳定的反馈和温度耦联,通过这种反馈和耦联,  $\text{O}_3$  的减少也使由  $\text{N}_2\text{O}$  产生的  $\text{NO}$  减少。300 架协和式飞机(英-法合制的超音速客机)的飞行将给同温层带来  $0.2 \times 10^8 \text{NO}$  分子/ $\text{cm}^2\text{s}$ ,如果目前天然的  $\text{NO}$  源确实使臭氧层减少一半的话,可以想象到这个额外增加的  $\text{NO}$  将可能使臭氧层减少 10%,这样一个减少将使 300nm 以下的太阳光辐照度增加 50%[参见(6-2)式]。

### 6.2.3.2 核炸弹产生的一氧化氮

热核爆炸在同温层的下部和中部产生大量的  $\text{NO}_x$ <sup>[15]</sup>,对于 1962 年核禁试之前由于核爆炸引起的臭氧层的减少有各

种估计,其范围从减少 3% 到减少 6%,复原的半值时间是 2.5 年,因此,即使是一场有限的核战争,其长远的后果也将是世界范围的,主要在 300nm 以下增加的太阳辐照度将给人类和其它动物群以及某些植物带来灾难性的后果。

#### 6.2.3.3 宇宙射线产生的一氧化氮

目前射到地球上的宇宙射线可以用超新星的爆炸来解释<sup>[12]</sup>,距地球 50 亿光年的一个超新星的爆炸可以使同温层的宇宙射线强度在几乎一个世纪里增强 40 倍,在这样的条件下,核辐射剂量率也将增加差不多同样的倍数,达到  $2.5\text{rem 年}^{-1}$ ,从而增加了辐射引起的癌症的发病几率 (rem 是“伦琴等效人”的英文字头的缩写,请参阅参考文献 16)。通过反应(6-7),一氧化氮的浓度可以比目前由各种来源造成的水平提高 1—10 倍,与此同时将引起臭氧层的明显减小。因此情况可能是:对于地球近处的超新星的爆炸,如果引起的辐射剂量不是致死的,但它通过使紫外线增强将会产生显著的生物效应。

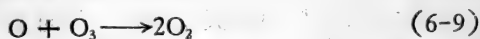
#### 6.2.3.4 氟氯甲烷的光分解产生氟

氟里昂 12( $\text{CCl}_2\text{F}_2$ ) 和氟里昂 11( $\text{CCl}_3\text{F}$ ) 大量用于喷气推进剂和致冷,由于它们在化学上的惰性,过去一直认为它们是无害的,但是,这部分卤代甲烷扩散到同温层后可以光致分解而放出游离的氯原子,这种游离的氯原子在催化臭氧的分解上[参见图式(6-4)]甚至比一氧化氮更有效<sup>[11]</sup>。到目前为止,大约已经生产了  $5 \times 10^9\text{kg}$  或  $4 \times 10^{10}\text{mol}$  的卤代甲烷,并且差不多都释放到大气中去了,1990 年左右,这些卤代甲烷在同温层里(在那里可以发生光解)将达到最大的浓度。一种大气层的模型预测:如果立即停止再释放任何卤代甲烷到大气



中去,由目前浓度的卤代甲烷引起的臭氧分解速率也将会增加,并在1990年达到最高点,那时卤代甲烷引起的臭氧分解速率在数值上可以相当于天然来源的NO所引起的臭氧分解速率。如果卤代甲烷继续以目前的速率( $\sim 10\text{kg/年}$ )释放的话,由氯引起的臭氧分解将在1986年时超过天然NO源引起的臭氧分解。

于是氯氟甲烷代表了一种潜在的对地球表面上所有生物的严重的紫外线的威胁,与臭氧和氧的反应预计的结果相比



如果天然存在的NO源使臭氧层的厚度减少一半是确实的话,由于氯氟甲烷的缘故,则似乎不可避免地会使臭氧层再进一步减少20—50%,这种减少将在今后持续几十年,因此,有可能使皮肤红斑区(图6-1曲线d)现在的紫外辐照度翻一番。

#### 6.2.4 紫外线增强可能带来的生物学后果

对于臭氧层可能减小和紫外线预计增强的主要关切是因为紫外线照射与皮肤癌之间存在着因果关系。皮肤癌作用光谱的峰值在297nm,在这个波长上,白种人角质层(一层死亡的表皮细胞)的光密度是0.5左右,而对色素很深的黑种人的角质层来说,这个值是2左右。根据对鳞状细胞癌和基底细胞癌(这两种癌几乎总是可以治愈的)以及恶性黑色素瘤(它往往是致命的)发病率的流行病学的研究,估计臭氧层减少5%将会使美国的白种人中每年增加8000例皮肤癌,死亡增加300例<sup>[17]</sup>。有证据表明,1966—1970年期间比起1951—1955年期间,由恶性黑色素瘤造成的死亡率有明显的增加(50—100%),它的原因还不大清楚。

除了人类的皮肤癌外，还有一些光生物学的领域可能受紫外线增强的影响。昆虫的视觉灵敏度可进入近紫外区<sup>[18]</sup>，因此作为一个例子，如果光谱辐照度的其他所有条件都保持不变，300 和 400nm 之间紫外线强度的增加将会改变蜜蜂眼睛里花朵的色彩。但这似乎不会造成识别上的问题，这是因为在整个白天和昆虫活动的整个季节内，紫外线的辐照度与 400nm 以上光的辐照度相比已经有很大的变化。在可能出现的最坏的情况下，假如昆虫的识别行为受紫外线光谱绝对辐照度的某一函数的特异性支配，那么这个光谱辐照度的变化也许会改变昆虫每天觅食行为的时相，甚至改变它们的地理活动范围(因为紫外线强度也是纬度的函数)。我们显然不十分了解这个光谱辐照度的改变对昆虫全部行为方式的影响，根据仅仅几年前很偶然地移殖到南美洲的一种非洲“杀人”蜂(不分青红皂白地刺人)从南美洲向北较迅速地迁移这一现象，可以推断光谱辐照度的改变可能只有很小的影响。在非洲蜂这个例子里，总辐照度中紫外线的相对比重随纬度的变化看来没有制止它们从赤道地区的光谱分布(紫外线成分相对较多)向较北的纬度迁移。

太阳的指向机制<sup>[19]</sup>部分地包括分析地磁极化平面和偏振光强度的能力，在测定地磁极化平面时，把太阳作为光源，空气作为射散体，眼睛作为分析器，某些节足动物则利用水面反射的偏振作用。在这些情况下，由于瑞利散射按  $\lambda^{-4}$  变化，紫外辐射的增强一般来说将会增强生物接收到的偏振信号。

对于昆虫趋光性的作用光谱也包括近紫外光。有一种白蝴蝶，雄蝶翅膀上的色素对近紫外光( $\lambda < 400\text{nm}$ )有非常专一的吸收，而雌蝶却对这些波长有很专一的反射<sup>[20]</sup>，雌蝶在 380—400nm 波长范围的这种反射是飞舞的雄蝶借以识别待交配雌蝶的媒介，而雌蝶这时停在植物的叶子上，并合上它们

的双翅,具有嗅觉功能的刺对于它们反到无关紧要。在这些波长上,臭氧的消光系数比 260nm 处的最大值小很多,臭氧层的少许减少将使紫外线大大增加(增加的比例与消光系数减小的比例大致相同),如果雄蝶的行为反应只和近紫外光的强度有关,那么由于信噪比的提高,对识别是一种有利的影响。如果识别涉及到色彩,例如蜜蜂对花朵颜色的视觉,那么对蜜蜂的论点也同样适合于白蝴蝶。

在植物的王国里,主要的功能是经过电子激发态做化学功,我们可以料到已经由进化产生了一个防止有害光化学反应的保护机制。在很多植物里,要最佳利用太阳光,就要求受到太阳光谱中“正常的”近紫外成分的照射,因此,对由于季节、气候条件和地理区域造成的光强的很大变化,植物的适应能力将是有限度的。各种各样的环境参数也影响着地球上植物的自然选择和它们的地理分布,这些参数包括温度、水和土壤的条件以及阳光,那些已经只在一些狭窄的生态带生长的阔叶农作物或者那些已经受到其它环境因素抑制的植物可能受太阳辐射中紫外成分变化的影响最大。通过这些例子我们可以得出这样一个结论:紫外线的增加可能会通过生态系统中多条复杂的途径,而不仅是通过引起急性的光化学损伤产生它的影响。

在养分丰富的地上水中,蓝光的吸收特别强,在 400nm 处每米水的光密度可以高达 3,并随波长变短迅速增大。这些养分丰富的水中的浮游植物不断地混入水柱,在白天它们被带到水面和较浅的深度,由于蓝光和紫外线的强度在水面上比在水柱的深层相对要高,所以浮游植物必须能够最大限度地适应变化范围很大的光谱强度的分布。其次,藻类必须最大限度地适应晴天和阴天时不同的光谱分布。浮游植物在晴天比在阴天多,而紫外线的相对贡献在晴天比在阴天高,于是

也许可以用浮游植物的增加来“指示”由于臭氧层的减少所引起的紫外辐照度的增强，这种解释也应该适合于清洁的低养分水中的浮游植物，现在还不清楚紫外辐照度的增大是否可能影响某些藻类的正趋光性<sup>[21]</sup>。显然，在紫外线对水生生物的影响方面还有大量的实验研究要做。

核战争或者超新星的爆炸可能带来的紫外辐照度的大增提出了一个完全不同的问题，但是，从已经讨论过的所有内容我们可以清楚地知道，人类将受到威胁（无论从光生物学角度还是从社会学的角度）。如果人类这个脆弱的物种都被毁灭的话，为了使人类得以生存而保护和培育的植物和动物品种的现存分布也就无关紧要了，但是生命将会继续，并可能通过一条更加意想不到的途径进化，产生一些生态学上耐受性更强的物种。

在结束臭氧影响的讨论之前应该总结几点，不幸的是，与核能和环境化学致癌这两个问题一样，在危害和利益的估价上一直存在着不同的意见，这里包含着科学研究资料不可避免的不完全给政治经济政策的制定所投下的阴影。目前已被人们“接受的”事实如下：

(1) 由于光合作用使水分解而放出的氧气，使大气中的氧含量从原始地球上比现在水平的 0.001 还低的起始浓度上升到目前大气中  $1.51 \times 10^5$  大气压-厘米的水平。

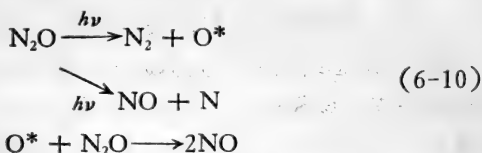
(2) 分子氧的光分解产生氧原子，氧原子与氧分子结合形成臭氧。

(3) 目前的臭氧层 (0.3 大气压-厘米) 是一个光平衡态， $O_3$  的化学催化分解和与氧原子的化学结合都影响这个平衡态。某些化学催化剂本身就是光解反应的产物，光解反应和催化反应都是光谱强度按高度分布、反应物、催化剂和温度的函数，温度的影响造成了臭氧层的厚度在一天之内的变化和

随季节的改变。

(4) 气候的任何变化都会改变光合作用的水平，它都应该在氧的平衡和  $O_3$  的稳态浓度上反映出来。

(5) 由于生物作用产生的  $N_2O$ ，大气中  $NO$  的天然浓度是不可忽视的：



这种  $NO$  的产生速率估计为  $2.5 \times 10^7 - 15 \times 10^7 \text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

(6) 任何人为增加的对臭氧的化学破坏都应该反映在  $O_3$  稳态浓度的减少上，但是，由于这些参数之间的反馈机制不清，所以  $O_3$  稳态浓度减小的幅度还不得而知。

(7) 每年生产的  $3 \times 10^8 \text{ kg CFCl}_3$  和  $5 \times 10^8 \text{ kg CF}_2\text{Cl}_2$  在 25 公里上空光照分解产生  $Cl$  原子，其稳态产生速率是  $5 \times 10^7 \text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

(8) 在实验室进行实验发现， $Cl-ClO$  链比  $NO-NO_2$  链在催化  $O_3$  的分解上要有效得多。

根据这些事实，我们可以得到一个合乎逻辑的结论：大量使用氯氟甲烷和向大气中排放一氧化氮将造成起保护作用的臭氧层的减少。问题是，究竟减少多少？

由皮肤癌发病率的流行病学研究估计臭氧层减少可能引起的有害效应时，遇到的一个问题是：服装习惯和度假方式的改变（于是多受紫外线的照射）、施用氮肥的日益增多（增加了大气中  $NO$  的水平）、污水的氯化处理（使大气中增加了氯的化合物）、光敏化药物、化妆品和环境污染物的未知的和可能是协同作用的效应等这些因素也许会掩盖或加剧最终的结果，因此对整个该学科领域必须更加审慎地加以检验。为了

估计臭氧层厚度的减少将会带来的生物学上的危险,必须对不同环境中紫外线的积分辐照度进行比较精确的物理测量,必须较准确地测定那些引起臭氧催化分解的源的贡献,必须估计出紫外线的增强对敏感生物种属的特定效应,还必须了解那些反馈机制(生物学和物理化学两方面的机制)。

在一切环境研究中都要考虑的一个问题是害益比的概念,这个概念给科学家们引进了一组奇怪的单位,它试图建立一个等式,该等式一边的量纲、单位或量不同于它的另一边,例如,在应用X射线的领域,人们知道辐射的增加一般引起寿命的缩短和癌症,但是我们又知道,在某些情况下少许增加的X射线致癌的危险被它在骨折接合、肠胃道检查等方面的诊断价值或X射线在治疗上杀伤恶性肿瘤的用途所抵消。虽然在这个医学应用中害益比概念的运用是最清楚不过的,但是当它被用于权衡核电站事故与我们对增加能源的需要时,当它被用于权衡刺激肺的危险与消除工厂和汽车污染物的经济成本时,当它被用来权衡某些海滩的破坏与在经济上娱乐上对船舶海运业、高尔夫球场和海滨别墅的需要时,这个概念就变得比较含混不清了。显然,这些害益的权衡还适用于抽烟、喝酒、滑雪、农作物的施肥和喷雾冷却罐中用的氟里昂等。

环境光生物学的任务在于了解光与生态系统各组成部分之间的相互作用,以便能够准确地说出某些扰动可能带来的影响。关于紫外线生物效应的更一般的讲述可以在参考文献[22]中找到。

### 6.3 水生光生物学

已经有很多文章论及了光合作用的机制和对于陆地动植物的研究。藻类(例如小球藻属)一直主要用于光合作用机制

的研究,直至最近,研究海洋浮游植物生态学的工作仍然比较少。概括起来说,各种不同的浮游生物生态系统都是由“蓝色的”水、低产量和低营养(养分不足)的水域构成的,这些水域是由于物理循环弱所形成的,其特点是: ①水平方向和垂直方向的平流弱;②输入的养分少;③光的贯穿情况接近于纯净海水的情况;④有机物浓度低;⑤在空间和时间上具有高度的连续性;⑥物种丰富程度的排列次序基本上不变;⑦就地再生的养分作为水生植物营养的主要来源。可以预期:在这些条件下进化的各种生物将适宜于保存较少的营养盐类,并具有争夺这些盐类的有效机制。这类浮游生物的生长时间相对较长,因此,为了保证顺利地繁殖,它们将不得不在一个相应的长时期内保护自己,以免被其它生物所捕食,海洋双鞭甲藻(*Dinoflagellate*)的生物荧光也许可以起阻止挠脚虫(甲壳类)捕食它们的功能<sup>[24]</sup>,因此它们能在很长的生长时期内具有很大的选择系数值。人们可以测量网状浮游动物(它们大到足以留在网眼大小通常在120微米的拖网中)排泄的营养物,并估计浮游植物和浮游动物之间营养循环的速率。在这个系统中必须估计: ①在营养物循环中浮游细菌和吞食细菌的作用;②在下沉颗粒的混合层中所含营养物的损失;③颗粒状营养物被迁移生物向上输运。

海洋生物种属谱的对生端可能出现在强环流占优势的海岸养分丰富的水域,在这种水域有一些容易辨认的特点,它们是: ①水平和垂直方向的平流很强;②输入的养分多;③光的穿透力降低;④有机物的浓度高;⑤空间和时间上变化大,这些条件给与那些生活在这种水域的生物一组完全不同的选择压力。输入的营养物多,使藻类的生长速度快,还可以预期,动物的行为方式也将表现出对表层和浅水层海水水流的适应性,由于这种适应性,它们的浮卵和幼虫才得以保留在生态系

统内。这些环境条件十分常见,并且选择压力是如此之大,以至我们可以认为浅水区的水生生物的特征已经按照这些环境条件进行了自然选择。

如果营养不足和营养丰富的生态系统类似于不同的生物社会,则以陆地生态系统的研究为基础的大量生态学理论也可以用来了解海洋。例如,水本身类似于陆地生物社会的土壤,即海水的化学性质受生物的影响很大,因此,在不同的生态系统里,海水的化学性质可能甚为不同。对浮游植物的生长来说,水的“合适条件”必然发生在比平流的时间尺度短的时间尺度上,因此,在营养丰富的水域,浮游植物的生长必然进行得快,而在营养不足的水域,生长期则可能长得多。较高的纬度造成不同平流状况下光强度的很大变化;例如,北冰洋的水产是弱的平流和长期的弱光形成的,白令海的营养丰富的水域则受光强季节性变化的影响很大。

第三种可以归为一类的生物社会是深海,它和前两类生物社会的区别在于缺少阳光,因而没有初级产品,它和其它生物社会没有联系,这个社会占海洋体积的  $4/5$  以上。深海是一个黑暗和阴冷的环境,其生理化学条件的季节变化很小,它的特征是极高的静水压,我们对生活在这个环境里的生物的进化适应能力的了解比对容易接近的海洋区域要少得多,但是,在深海发现的数目惊人的生物品种说明: 这个环境并非敌视生命。

### 6.3.1 河口的生态系统

沿海营养丰富水域的生物社会属于河口生态系统。在河流入海口(例如营养充足的切塞皮克海湾),水的运动(潮汐,从下游支流流进海湾的水流)和气候条件变化的时间尺度使我们不可能用稳定态描述浮游生物的生态系统,它们总是向



一个新的稳定态变化。此外，由于这种水域的水浅和海岸线环绕，沼泽的、海底的(生长在海底的)和浮游的生物社会之间存在着较强和较复杂的相互作用。

许多河口研究的最终目标都是为了弄清影响水生生物生命活力的那些因素之间的相互关系，特别是对那些有经济价值和有利娱乐和观赏的品种，从而为最有效地利用这种生态系统奠定基础。人们可以提出一些关于如何处置生态系统某一部分的建议，例如，是否让氯气处理过的废水直接排放进一个鱼类产卵的水域？或者是否要在一个水生动物养殖区内设置自来水的吸水口？这种有关生命循环关系和生理学方面的一般知识往往能给出正确的劝告，并可避免一些灾难性的后果。但是，在因果关系不那么明显或者营养水平之间有复杂相互作用的情况下，就不存在一个预卜先知的模型，这一方面是由于最重要的摄食类水生生物(贝壳类、鱼类和蟹类)的生命循环很复杂，也由于所有这些生物物种之间营养的相互作用很复杂，另一方面还由于对这些自然界的生态系统进行实验时的变量(一天的、季节的和年的变化)太多。由于浮游植物的生长时间很短(几小时到几天)，它们的移动能力又差，因此可以估计到它们的生长和生理状态可能强烈地与反映它们特殊的地理区域特征的物理和化学的环境参数发生联系，由于这种强烈的联系，应该有可能用一个强烈衰减的准稳定系统来描述不移动的浮游作物的生长和分布的动力学，这个准稳定系统受一个反映周围物理和化学环境所决定的天然扰动的强迫函数的支配，这个扰动可能是由一场大雨带来的养分的 $\delta$ 函数，它可以是早春或晚秋的温度变化，它还可以是一次有意给予环境的有毒物质。由于水的交换，多余的养分和生物的扩散损失以及由于被浮游动物摄食造成的浮游植物的损失都属于衰减因素。

假如知道较重要的生理速率常数和它们与功能的关系,并把反馈包括在内,就应该有可能确定生态系统稳定性的极限,即预测物理和化学的环境参数(养分、温度、光,等等)的最高的稳态水平,不超过这个稳态水平,天然的浮游生态系统才能从大的天然扰动下恢复过来,因此,那些最高的水平和观察到的水平之间的差别(无论其重要性如何)将是该浮游生态系统稳定性的一种度量。我们认为营养和营养的转化,盐分、温度、混浊度、物种的选择和继承、摄食和水的交换这些因素之间的定量关系是可以测定的,然后将得到一些特殊的参数,这些参数可以作为生理状态和过去历史的诊断指标,并帮助人们预测浮游植物群体的稳定性,针对所提出的营养、盐分或热负载的数据,这些关系应能帮助我们预测浮游植物群体变化的方向。

在自然界的任何生态系统的研究中,实验者都可以把样品搬到实验室,在可控制的条件下进行研究。但是,具有各种各样群体的自然界的生态系统在任何时候都是包括所有出现的周期不定的气候、生物和化学相互作用的一个整体,因此,在一个自然界的生态系里得到实验上的重复是很困难的。我们立即面临这样一个问题:如何在这种可变的系统中进行有统计学意义的测量?让我们考虑一个有待测量的自然界生态系统;总的测量误差将包括与“处理”或强调所希望加以分析的效应有关的误差,和由于风,潮汐,阳光,降雨等方面的日、季和年的涨落引起的生态系统的大的自然变化。因此,原则上一个生态系统“以前”和“以后”的基准线的研究将会遇到这两方面的误差来源,只有产生足够大的平均差别(即以前的减去以后的)的“处理”才能以一定的统计学显著性进行估价。由于诸如标准偏差、 $\chi^2$ 方检验、Student氏 $t$ 检验、 $F$ 方差比检验、Chauvenet氏判据和可信度这些统计学参数只有在假定测

量数据是正态分布的情况下才可应用，于是使问题进一步复杂。再者，如何对从一个季节到下一个季节、从一年到下一年的这些量的时间平均值的差给出可信度呢？应能选择第二个生态系统，它对天然涨落的响应类似于第一个系统，但是在没有那个特殊的“处理”时又不同于第一个系统，在这些条件下应该能够分析这两个系统之间的差别，并把大的天然变化与处理的效果分开，通过这两个系统的比较，差别平均值的期望值经过适当地归一化后应该是零。除开测量误差外，每一系统内的不均匀性和它们对局部气象的变化作出的不同反应也将使服从统计分析的差值产生一个正态分布的离散，巧妙的办法仍然是使用两个可以比较的系统。对于变量总数和这些变量间的函数关系不十分清楚的任何生态系统的研究，都有一些基本的限制，人们不得不就待测的参数、取样频数、取样区域和待取样的物种等项作出一些合理和直观的决定，但是所有这些参数和取样的方式都只能在研究计划的物理和财政的限度之内。数据收集在时间速率和空间梯度两方面都存在一个阈值，低于这个阈值，研究工作就降低成一个收集数据的练习了。

在环境研究的这个领域，人们必须仔细地限定要由一系列实验回答的一些专门的问题，其中的一个问题涉及到海洋的水下阳光和养分丰富的河口水下阳光之间在光谱上的明显不同，是什么决定了河口处水的光吸收率？由此造成的水下光谱辐照度的改变是如何选择出那些具有能适应该光谱区的辅助色素(天线叶绿素)的浮游植物？

### 6.3.2 水下阳光的谱分布

在大多数养分丰富的河流入海口，透光层的深度是十分有限的。赛克琪圆盘(一种白色的漫散射圆盘)在水中看不见

时的深度可能低到 0.5m, 这个深度的阳光强度大约相当于水面光强的  $2/10$ , 作为一个粗略的近似, 阳光强度减小到它在水面数值的 1% 的深度是赛克琪圆盘的轮廓变得模糊不清时的深度的三倍。由于这种方法是一种视觉的方法, 它度量的是人类明视觉波长范围内的相对吸收, 明视觉的峰值灵敏度位于 555nm, 介于叶绿素的吸收峰和大多数吸收蓝光的辅助色素的吸收峰之间, 因此人们必须作一个不完全正确的假定, 即吸收系数不随深度或泥沙的含量而变。图 6-3 对切赛皮克海湾的一个河口给出水面和水下 0.8m 深处阳光的相对谱分布, 0.8m 相当于当天赛克琪圆盘在水中达到看不见时的深度。曲线表明: 这些水的消光系数不能用一个数值来代表, 而是在光谱的蓝区要高得多, 而且还受到浮游植物造成的光吸收的影响。

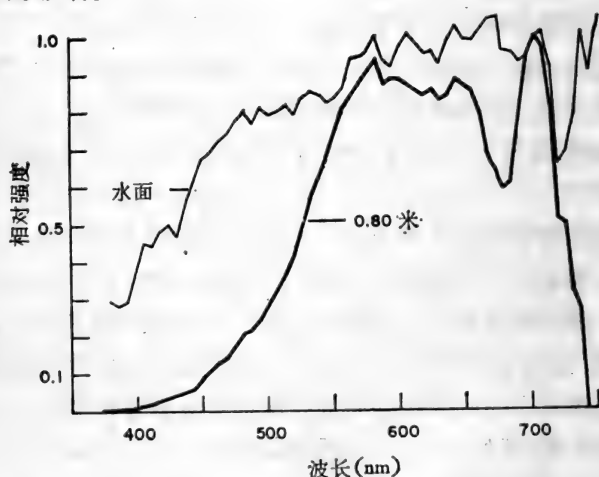


图 6-3 1972 年 7 月 27 日射在罗得河 (Rhode River) 水面和水下 0.8m 深处的阳光的相对光子谱分布, 强度数据都以 710nm 处的值归一化处理(引自参考文献 25)。

图 6-3 的主要意义在于说明河口透光区内在 500nm 以

下的波长上有明显的吸收,正像海岸和大洋水在大于 600nm 的波长上有强烈的吸收一样<sup>[26]</sup>(请看图 6-1 里的曲线 4),原来的太阳光谱有了明显的畸变,蓝光吸收(真正的吸收和散射)的平均自由程从最清洁的大洋水中的 33m 变为切赛皮克海湾的一个河口——罗得河里的 0.5m。由于泥沙和养分流入河口,光也许是对浮游植物生长的一个限制因素,混在水柱里的浮游植物在它们的大部分日照时间内可能处在低于使它们的光合作用达到饱和数值的光强下,泥沙含量的有时减少可能造成水柱里浮游植物产量的增加。但是,伴随泥沙而来的养分与向浮游植物和浮游动物提供养分时泥沙(包括碎石)的直接和间接影响之间的关系还没有完全弄清楚。

### 6.3.3 双鞭甲藻的积聚机制

在泥沙沉积属自然现象的条件下,可以预期将会选择出一种能运动的有正趋光性的藻类,这种藻类可以在一定程度上克服垂直的平流混合。在白天的大部分时间里这些藻类将在水面附近度过,因而它们能比不具运动能力的真正的浮游植物获得更大的光合作用产率,这样就会造成一个负的梯度,或者有时将使浮游植物浓度的垂直分布在水面附近出现一个峰值,这类型式的垂直分布是河流入海口处双鞭甲藻群体的特征。图 6-4 上给出了切赛皮克海湾里双鞭甲藻群体在垂直方向上的这种有峰值的分布<sup>[28]</sup>,在这种情况下,浮游植物的有效浓度以可提取的叶绿素 a (藻类的主要光合作用色素)的浓度表示(图上的实线),它也可以用活体内叶绿素 a 的荧光来表示,活体叶绿素 a 的荧光将在下一节中讨论。

在图 6-4 中,代表浮游植物浓度的叶绿素 a 的峰值非常接近于水面,大约离水面 0.25—0.50m。但是我们时常发现,矽藻 (*Cerataulina bergonii* 和 *Rhizoselenia delicutula*) 在切赛皮克

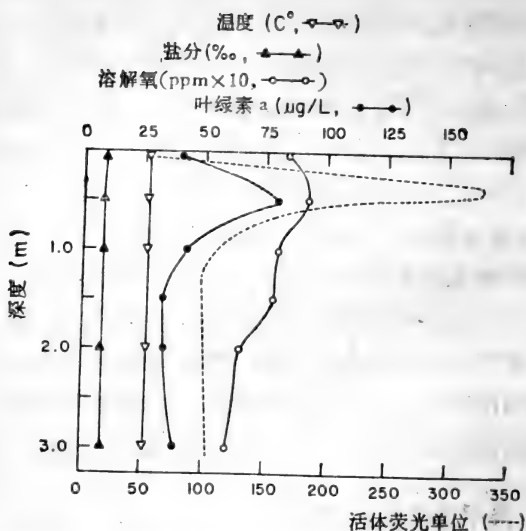


图 6-4 在切赛皮克海湾 (北纬  $38^{\circ}59'$ , 西经  $76^{\circ}23'$ ) 的海湾大桥附近, 温度、盐分、溶解氧 (D. O.)、可提取的叶绿素 a 和叶绿素 a 的活体荧光的垂直分布, 测量是在 1971 年 8 月双鞭甲藻的生长季节进行的 (引自参考文献 28)。

湾内却主要浓集在 4m 到 8m 之间的深度上, 在这个深度, 水下阳光的强度仅为水面光强的 1% [29]。

这两个例子给出了大洋、海岸和河口水域里一般出现的与浮游植物数量有关的现象的两个极端, 这种现象是浮游植物对光的行为反应, 是浮游生物群体在由于密度的不连续 (这种不连续是由盐分或者温度引起的) 而和其它海水分开的一定的水域内作物理迁移但又不会离去的现象, 这些浮游生物常常沿不同的方向运动。在图 6-4 的浮游植物数量分布的例子中, 叶绿素浓度的峰值在不到 0.5m 的地方, 它们不是由于与光强有关的趋光寻找机制才选择这样一个深度的, 从早晨一直到光最强的中午, 这个峰值始终保持在同样的深度, 它是由于流入表面的低密度河水中不含这些双鞭甲藻而造成的假

象。当测量水的密度垂直分布时,我们发现密度的不连续点(比重突变)也恰好在 0.5m 的地方,并发现表面水的流动矢量不同于 0.5m 以下的水流矢量,这种不连续性发生在 0.5m 以内的表面水层中,它说明在比海岸和大洋水浅的河流入海口处有时也需要了解不同深度的情况。

当矽藻浓集在 4—8m 的深度时,水的密度的垂直分布图表明:在 3m 处有一个比重拐点,并在 9m 处有第二个更大的比重突变<sup>[29]</sup>,因此,可以在密度既不同于最上层也不同于最下层的中间水层里找到浮游植物。除非知道水的循环方式,否则根据浮游植物分布的数据有可能得出错误的光生物学的解释,例如,对矽藻分布的数据(如果没有水的密度分布资料)就可能作出一个貌似有理实际是错误的解释:在上层水中营养(硝酸盐和磷酸盐)被消耗殆尽,所以矽藻沉到一个养分更多的区域,于是矽藻为了得到较高浓度的营养,不得不牺牲光的强度。从这个例子可以学到的知识还有这样一点:环境光生物学涉及到生态系统各个部分的相互作用。

在风平浪静天空晴朗的条件下,正的趋光性会使双鞭甲藻大量集聚,形成许多有颜色的斑点<sup>[30]</sup>,这是形成双鞭甲藻花和红潮的机制之一,这个现象有几点重要的启示:

(1) 浮游植物群体在一些水层中的相对的聚集是有高度选择性的,它选择那些能够忍受这些水层特有的光强和养分浓度范围的浮游植物品种,因此它能够造成一些特殊的浮游植物在水面下迁移相当长距离的情况,当这些水混进营养丰富和温暖的沿海岸的表面水时,这些迁移的浮游植物可能再通过正的趋光性开花和形成致密的水面斑点。

(2) 关于利用海水的反射光学性质从飞机或卫星上监测浮游植物群的概念还有一些严重的障碍,在计算和测量海水的光谱反射特性时,人们假定叶绿素的浓度是均匀的,但是浮

游植物(叶绿素)浓度的垂直分布很少表明叶绿素的浓度是均匀的。4m 和 8m 深之间的矽藻浓度将不能由光谱反射率数据探测到,图 6-4 的双鞭甲藻的浓度将会造成对表面水中叶绿素平均浓度过于偏高的估计。

(3) 在营养丰富的河流入海口,蓝光的强烈散射和吸收可能选择那些辅助色素的吸收落在较长波长区的浮游植物,因此,河口生态系统里的水层输运机制应该选择这样的浮游植物:① 它们具有正的趋光性;② 它们有在绿区和黄区吸收光的辅助的光合作用色素(多甲藻黄素,藻红素);③ 它们能容忍变化范围很宽的盐分、温度和光强。

总结起来,双鞭甲藻的局部的大量积聚是由正的趋光性、合适的辅助色素和大的生长耐受能力三者与下列因素结合在一起造成的:① 限制在一些水层中,这些由于密度不连续而分层的水层作横向运动;② 在沿海岸的浅水中,垂直方向的平流使得下层的水混进表面水中;③ 强劲的海岸风产生一些吹干的双鞭甲藻;④ 不同密度的水再会聚;⑤ 被风驱动的对流小区。

五月末六月初,在北切赛皮克海湾(北纬  $39^{\circ}00'$ ) 开花并形成稠密的可见斑点的双鞭甲藻 *Prorocentrum mariae lebouriae* (最小的一种双鞭甲藻)在三个半月的时间里被表面水从海湾嘴(北纬  $37^{\circ}03'$ ) 向外推移了 216 公里的距离,这个过程被认为是上面讲的过程①、②和④合作的结果。

在切赛皮克河口,营养物的浓度有一个从支流到主河再到中央海湾然后南下到大海的梯度,那里是一个表面水一般向南流而底部的水向北流的双层系统,在这个双层系统中,十分有利于那种可以周期性地迁移到上层表面水然后又迁移到底层水去的生物的生长繁殖,与潮汐适当地配合,这种生物就能借助周期性的垂直迁移得到一个净的向北或向南的横向位



移,或者也可以不动。由于浮游植物都是光合作用的生物,它们应该表现出太阳相位的光周期的节律,白天是正的趋光性(向上的运动),夜晚的 12 小时则向下运动(趋地性或趋化性\*),只有那些每小时能游动 1m 左右以便在适当的时间内利用这种双层系统中上下水层里的水流的生物体(较大的双鞭甲藻)才能生长繁殖。

双鞭甲藻(*Ceratium furca*) 在切赛皮克海湾表面水中昼夜夜止的迁移可以从图 6-5 上推理得知,这些数据是以下列方式取得的:当调查船匀速向南沿横切区运动约 30 公里时,不停地把 1 米深处的表层水抽入一台流动式细胞荧光分光光度计。清晨,双鞭甲藻均匀地分布于整个水柱内,因此活体叶绿素 a 的荧光较低(虚线)。晴天时,这种生物向水面迁移,然后在下午往回运动,这时再在 1m 深处取样,发现 1 米深处的浓度高了很多,这是正趋光性的结果(例如,请看图 6-4 上叶绿素 a 浓度的峰值)。浓度沿横断面随距离的振荡是实际的情况,它给出由于当地的刮风特点和表面水流造成的这个生态系统的外观斑纹。这个图说明了对河口生态系统中浮游植物进行有统计学意义的测量的困难,浓度在垂直方向和横方向上可能都有变化,变化的情况取决于物种、一天之中的什么时候、潮汐的相位和气候条件。我们能够进行有意义的河口光生物学的测量,但是方法和手段必须是多学科的。

罗得河里的一种不同的双鞭甲藻 *Gymnodinium nelsoni* 在夜晚向下迁移到中间水层,而在白天向上迁移到表面水中,白天向上和晚上向下的结合是为了在晚上利用中间层水和底层水的较高浓度的养分,并减少比水柱内均匀分布的微浮游生物(其线度小于 10 微米)大的双鞭甲藻与海湾水的交换速率,

\*趋地性指生物的生长或运动趋向或离开地球之趋势,即生长或运动受重力的影响。趋化性指生物体的运动由化学物质的浓度梯度所引起。——译者

于是,这种双鞭甲藻的数量要比仅仅根据表面水中可溶性养分的浓度所预计的数值高得多。

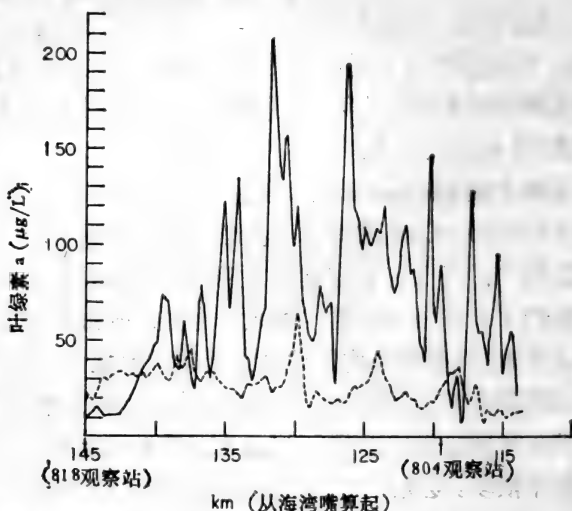


图 6-5 1974 年 8 月 12 日测定的 1m 深处双鞭甲藻的活体内叶绿素 a 的荧光在表层水中由北向南的变化;虚线是早晨(8:50—10:50)在帕图克森特河(818 站)南段 1m 深处的横切线上的变化,实线是同一天的下午(14:30—17:30)在同一横切线上 1m 深处的变化。由于横切面穿过整个双鞭甲藻集聚的区域,所以这两条曲线下方面积积分的比值是双鞭甲藻向最上面的 1m 表水层迁移的度量(引自参考文献 31)。

#### 6.3.4 浮游植物的现有产量

在切赛皮克海湾的一些支流河口和中央海湾,80%到90%的浮游植物的初级产品是来自微浮游生物的。水柱和混浊度的稳定性使混合充分的表层水包含了能使光合作用进行的整个光强范围,也就是说它是透光的。叠加在这个平均 10—20  $\mu\text{g/l}$  可提取的叶绿素 a 背景上的是一片有季节性的强烈趋光的比较大的双鞭甲藻,在上海湾生长的是下列品种的双鞭甲藻: *Prorocentrum mariae lebouriae* (一种最小的甲藻)、

*Gymnodinium nelsoni*、*G. splendens* 和 *Katodinium rotundatum*，在下海湾生长的是双鞭甲藻 *Ceratium furca*。在微浮游生物生产的第一个循环和捕食微浮游生物之后，这些双鞭甲藻的浓度增加起来，在溶解的无机氮和无机磷向有机物形式的转化和这些种类的双鞭甲藻的出现之间似乎存在某种相关性。

#### 6.3.4.1 叶绿素 a 的测量

比较重要的测量之一与估计浮游植物现有的产量有关。很明显，列举浮游植物的品种和数量浓度是意义不大的，这是因为品种的数目很多，品种中间的大小分布很宽（从  $2\mu\text{m}$  的蓝绿藻到  $6\mu\text{m}$  的金黄藻，再到  $70\mu\text{m}$  的双鞭甲藻和长度达几百  $\mu\text{m}$  的矽藻链），而且这些品种中光合作用的效率有时有很大的变化。

由于我们关心的是浮游植物和它们的初级光合作用产品，又由于叶绿素 a 是主要的光合作用色素，因此，对浮游植物现有产量的一种可能的测量办法是测定叶绿素 a 的体积浓度，这是一种广泛用于浮游植物生态学的化验方法，它的理论基础如下。

叶绿素 a 的功能是敏化由吡啶核苷 NADP 到 NADPH 的光还原，并生产 ATP。如果我们假定在这个光还原系统中有一个共同的速率限制反应，于是，在光很强时（光合作用达到饱和），固碳的速率将直接正比于主要的叶绿素 a 分子或反应中心的数目。因此，浮游植物里所含叶绿素 a 的体积浓度<sup>[32]</sup>应该和这块体积水的光合作用潜力有关。这个最大的固碳速率可以认为是碳的全部质量 (C) 的一个恒定的分额，如果

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dt} = \text{常数} \quad (6-11)$$

在光饱和的情况下，

$$\left(\frac{dC}{dt}\right)_{\text{最大}} \sim [\text{叶绿素 } a] \quad (6-12)$$

于是有

$$\frac{[\text{叶绿素 } a]}{C} = \text{常数} \quad (6-13)$$

因此,测量特殊叶绿素  $a$  的体积浓度应该是浮游植物中碳的生物质量的一个合理的近似。在实验室培养的浮游植物和处于对数期生长的天然浮游植物中,每个生物的叶绿素  $a$  的质量看来是相当恒定的,对碳与叶绿素  $a$  的比值作了测量,其数值为 50—100g/g。

测定天然水样的叶绿素浓度有一种迅速且可以重复的方法,通过一个水管把水样抽进一台荧光分光光度计里,观察荧光分光光度计测量体积内活体叶绿素  $a$  的荧光强度<sup>[28]</sup>。这种连续抽吸样品测量活体荧光的技术在时间和空间分辨能力上均比手工取样测量具有明显的优越性。

活体叶绿素  $a$  荧光技术的基本前提是在观察到的活体样品的荧光强度和可提取的叶绿素  $a$  ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 之间有一个不变的比值:

$$R = \frac{\text{活体净荧光强度(任意单位)}}{\text{可提取的叶绿素 } a (\text{mg}/\text{m}^3)} \quad (6-14)$$

长期以来,人们一直认为叶绿素的活体内荧光效率是它在光合系统中的状态的指示,活体内荧光的量子产额的增加被认为是光合作用效率低的度量,因为荧光代表了可以在光合作用过程中转化为化学能的自由能的损失。

活体内叶绿素  $a$  的荧光技术是一种测定浮游植物现有产量的方便而迅速的化验技术,它虽然很有吸引力,但也不是可以随意使用的<sup>[29]</sup>。当品种的组成保持相对不变时,用提取叶绿素  $a$  的方法测定  $R$  值[公式(6-14)]将适用于适当的时期和

足够大的调查区域,这时,提取后再测量的方法是有价值的。

#### 6.3.4.2 三磷酸腺苷的测量

因为光子探测技术有极高的灵敏度,又由于 ATP 普遍地存在于所有的生命形式里,所以在美国国家宇航局(NASA)探测太空生命的计划中提出了一种方法,它是在充氧的缓冲溶液里加入过量的虫萤光素、虫萤光素酶和  $Mg^{2+}$  离子,用这种体外的反应混合物探测萤火虫的生物荧光,在这种充氧的缓冲溶液里可以加入从太空取得的样品。发光将是对 ATP 的直接证据,多半也是对活的生物过去合成的 ATP 的证明。用最灵敏的仪器,这种化验技术能够探测低到  $0.01\text{pg}$  (微微克)或  $2 \times 10^{-5}\text{pmol}$  (微微摩尔)的 ATP,在使用未完全钝化的虫萤光素酶时,“残余光”的存在使该技术限制到  $1\text{pg}$  ATP。发光的动力学表明,发光强度先上升,峰值高度取决于注入的迅速程度和注入后的混合,然后光强有一个复杂的衰减,衰减的情况取决于虫萤光素酶的纯度、浓度和 ATP 的浓度,一些研究者喜欢用该闪光的高度,另一些人则倾向于用某一固定时间内光强的积分。

用目前的一些技术可以探测少到  $10^4$  个大肠杆菌细胞,每个细菌含有  $10^{-16}\text{g}$  ATP。

在海洋生物学中现在用 ATP 化验法测量深度在阳光充足区下方大洋水中异养生长的细胞和阳光充足的水层里浮游植物的生物质量<sup>[34]</sup>。在阳光充足的水层,根据样品是取自大洋水、较混浊的沿岸海水还是非常混浊的河口水,生物质量可以占全部有机质的 20% 到接近于 100%。ATP 存在于活细胞里,它从死亡的细胞里迅速地扩散出去,一般来说,它们不大会吸附在沉积物和细碎的颗粒上,但是,如果对大量含有许多泥沙沉淀物的水进行过滤的话,吸附就不能忽视了。我们

发现,细胞中有机碳的质量与 ATP 的比值对海洋和淡水的藻类接近于 286g/g,而对细菌、霉菌、肿瘤细胞和一些浮游动物则是 250g/g。对于天然的浮游植物样品,人们发现碳与叶绿素 a 的比值是 50—100g/g。ATP 化验法可以验证为估计表层水中生物质量所作的对浮游植物(浮游植物是表层水中全部有机碳的主要来源)叶绿素 a 的化验,它的另一个优点是可以给出总的生物质量数,即

碳(来自 ATP) — 碳(来自叶绿素 a) = 异养的碳 (6-15)  
 式中异养的碳是参与非光合作用生产或次级生产的生物质量。由  $^{14}\text{C}$  研究得到的与初级生产(摄碳)速率有关的浮游植物中碳的质量将给出该体积水中光合作用的总生产速率常数,知道了这些速率常数和浮游植物中碳:氮:磷的比值,并测量取样水中可溶性氮和磷养分的浓度,就能计算出营养的周转率,这个周转率在对生态系统的任何系统处理方法中都是很重要的。

C:ATP 比值法的一个优点是由关系  $(\text{C})[\text{g}] = 250(\text{ATP})[\text{g}]$  算出的碳代表着活的或原生质的碳,这种碳不同于腐朽的碳(即来自过去是活的动植物的有机微粒碳),于是比值

$$\frac{250(\text{ATP})[\text{g/l}]}{\text{化学测定的所有微粒状有机碳}[\text{g/l}]} \quad (6-16)$$

就是水样中活有机体中所含碳的分额,在养分不足的水或深水(>1000m)里,这个比值可以是 1—10%,在营养充足的沿岸海水中,这个比值接近于 100%。

数值为 250—300 的 C:ATP 的比值 [g/g] 对天然水中处在“正常的”指数生长期的各种浮游植物、浮游动物和海底无脊椎动物都是适用的,但是,即使对于生长在恒温器的细菌,观察到的数值却从 91 变到 333。对于在营养严重不足(缺铁、氮、磷)条件下培养的浮游植物, C:ATP 的比值可能高达

2000。利用与体内叶绿素  $a$  荧光效率的情况同样的类比,  $C:ATP$  的比值和在亮-暗照光或试验照光下该比值的动力学变化, 可以作为生物机体生理状态的一个诊断指标。

### 6.3.5 光和光透区的填充

靠近水面的混合层厚度和光透区的深度之间紧密相关, 这一点在生态学分类上很有意义。颗粒状植物色素造成了在营养充足的河口水中对光的主要吸收, 泥沙散射体的存在(混浊度)使下射光的有效几何路程增长。在少雨酷晒期以后的八月末, 切赛皮克海湾里的混浊度是最轻的, 这时, 在整个靠近水面的混合层里都有足够的光强保证浮游植物的生长, 它们的浓度不断地增加, 直到它们吸收掉这个靠水面的混合层里用于光合作用的全部入射光, 这是一种理想的情况。浮游植物的生长速率减去由于水的交换和浮游动物的捕食造成的浮游植物的损失速率使浮游植物的浓度维持在一个稳定不变的状态, 它使全部得到的光都用于光合作用上, 因此光透区的厚度就等于靠近水面的混合层的厚度。

当靠近水面的混合层里的养分浓度降低时(营养有限的情形), 浮游植物的生长速率常数较低, 这时靠近水面的混合层中浮游植物的浓度将不足以吸收掉全部可用于光合作用的光, 于是光强减小到表面光强度 1% 的那个深度将处在靠水面的混合层的下方, 即 1% 光强的深度大于比重突变的深度, 也即大于靠近水面的混合层的厚度。

当靠近水面的混合层里的养分水平由于河水的流入而增高时, 河水还携带着泥沙, 由泥沙增加的散射加上光合作用色素浓度的增加所增加的光吸收使光透区的厚度压缩了, 从而使它这时的厚度小于比重突变的深度, 这就是光照有限的情形。

上面的两种情况都是暂时的现象，当河口的条件季节性改变时，它们都将接近理想的效率（1% 光强的深度等于比重突变的深度）。在光照有限的情形，由于泥沙的沉淀和与浮游植物的浓度保持同步的摄食增加，也将达到最有效地利用光的状态（图 6-6），即浮游植物靠太阳和风能在其中迁移的整个靠近水面的混合层将吸收掉全部可得的光能用于光合作用<sup>[31]</sup>，在这样的条件下，较小的、相对来讲不活动的微浮游生物就不需要任何正的趋光性了。

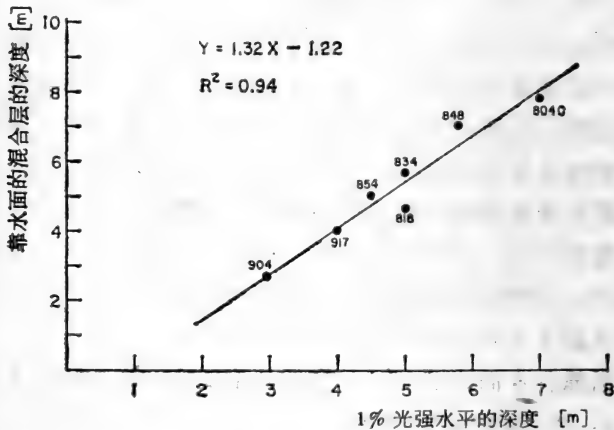


图 6-6 1974 年 8 月份，切赛皮克海湾里靠近水面的混合层的深度与光透区深度（它多少有点任意地被规定为表面光强的 1%）之间的关系，与数据点相对应的那些观察站的数字是纬度的缩写，即：848=北纬 28°48′，808=北纬 28°08′，C 表示该纬度上的一个特定的经度。Y 和 X 是线性回归时所用的座标， $R^2$  是回归系数（引自参考文献 31）。

从这个一般性的描述中我们可以看到，只要知道相互作用的机制，就可以通过对光强和水密度的垂直分布进行简单的物理测量来监测极为复杂的营养-浮游植物-浮游动物的循环。



### 6.3.6 结 论

在河流入海口这种复杂的水生光生物学情形，人们一直在努力研究光和主要生产者——浮游植物的相互作用，有必要追踪包括碳在内的无机养分是如何通过浮游植物参入到一个更高一级的营养水平——食草水生生物中去。

即使是对整个河口生态系统的这一小部分来说，实验者不能直接控制的变量数目也是相当可观的，气候条件的迅速变化和季节、年份的很大涨落这些进一步的复杂因素使问题变得非常困难，相对来说，比较宁静和变化较小的大洋生态系统反而容易研究。但是，河流入海口是很多海洋鱼类产卵和幼苗养殖的水域，它是螃蟹、牡蛎、贝螺、蛤和各种市售鱼类的来源。河口沿岸又是人类生活和工业发达的区域，因此，它的保护和不断地健康发展是至关重要的问题。

这一章里给出的一些例子仅仅是初步触及了一下环境光生物学这个复杂的领域，光生物学已经成为一个学科交叉的领域，它包括分子的电子激发态物理学和复杂的生物系统中这些激发态反应的化学，例如光合作用、视觉和DNA的损伤与修复。光生物学扩展到环境光生物学还要加上另一个有待考虑的重要方面，即一个光生物学上完整的生物与它的环境的相互作用。在浮游植物的水生生物学中，了解光合作用的机制是必需的，但这还不够，学生必须了解趋光性、光对代谢路径的调节、辅助色素的分布、营养生理学、各级浮游植物的分类学、大洋、沿海和河口生态系统中水的散射和吸收特性，必须了解在这些系统中水循环情况的水力学、浮游植物的营养来源和影响捕食浮游植物的一些因素。

环境光生物学是一个迫切需要的课题，它是一门一方面需要专门的技术，另一方面需要有宽广的普遍概念的学科。

必须建立一些新的系统分析的方法,这种方法类似于对人的健康情况所作的分析,假定人这个系统处于某一个稳态,血压的读数、尿和血的分析或运动后脉搏速率的恢复都是与人这个系统的总的功能有关的诊断指标,往往并非必须分离和化验所有的酶循环、激素和抗体。医生的诊断检查来自于对人体生物化学和生理学的了解,在环境光生物学中也是如此,人们应该有可能了解生物机体的需要、相互作用、生物化学和生理学,以及由环境造成的外部的物理和化学因素,根据这些知识,人们应能描述出对该环境里的生物的一系列诊断指标。对那些热衷于充分运用光物理、光化学、生物化学机理和数学模型等所有科学领域的学生和那些愿意走出条件可以控制的实验室用自然环境里的全部生物进行研究工作的大学生来说,这是一个令人神往和不断有所发现的境地,是一个充满活力的领域,是多学科的科学学家们渴望的领域。除了它们固有的科学价值外,这些问题还极大地关系到如何正确使用我们这个日益拥挤的星球上的资源。

## 6.4 实 验

如果能用放射性示踪技术测量无机碳的总的摄取速率(它反映了藻类生长速度的一个方面),那将是很有补益的。这个技术的基本要点在参考文献 32 的 267—274 页上讲到了,但是应该向那些较好地掌握了测量技术的学生提出下列的建议和简化步骤。

从有一般营业执照的商社可以买到  $^{14}\text{C}$  标记的  $10\mu\text{Ci}$ (微居里)的碳酸氢钠,实验室可以去订货,而用不着建立特殊的放射性设施。大多数大学都已经使用研究用放射性物质的执照,放射性碳酸氢盐溶液可以通过辐射安全员去订货。学

生应能使用液体闪烁计数器,但如果做不到这一点,那么在微孔滤膜上收集到的样品可以放在含 3ml 二氧六环的液体闪烁玻璃瓶中长期保存,以后可以在任何时候把玻璃瓶拿到有液体闪烁计数设备的实验室去测量;任何以二氧六环为溶剂的液体闪烁液都可以放进这些玻璃瓶进行样品计数,由于 $^{14}\text{C}$ 的半衰期是 5780 年,所以分析之前放射性活度的衰变将是忽略的。

任何海洋或河口的天然水样都能用来作为浮游植物的来源,如果能得到实验室培养的浮游植物,那就更好了。作为一个粗略的经验,取浮游植物溶液的样品放进一个玻璃试管并置于暗室,等待 15 分钟以便让眼睛适应黑暗,然后用“黑光”灯(发射紫外线  $365\text{nm} + 405\text{nm}$ )照射试管,如果可以看见叶绿素的红色荧光,则该样品中定含有足够的藻类,从而在摄入实验里给出好结果,但不要这个样品做实验,因为过多的紫外线可能杀死了一些水藻。

放射性碳酸氢盐应溶在经  $0.22\mu\text{m}$  或  $0.45\mu\text{m}$  (孔径)微孔滤膜过滤的天然水或培养基里,制成活度大约为  $0.5\mu\text{Ci ml}^{-1}$  的溶液,我们在每个含 100ml 藻类样品的玻璃瓶中加入严格为 1ml 的这种示踪碳酸氢盐溶液。为了保证光照条件不变,培养时应使用冷白荧光灯,所有样品瓶(包括一些不透光的黑瓶子在内)都应装入 100ml 的浮游植物溶液。为了使这些浮游植物能够适应它们将要在实验室里受到的最强的光照,这些样品瓶在往里加放射性示踪的碳酸氢盐溶液之前,要放在距两根荧光灯组成的一个光源一定距离( $\sim 15\text{cm}$ )的地方至少 1 个小时。在“亮”瓶子外面包上一层、两层或三层普通的塑料丝网屏蔽材料(作为中性滤光片,请参阅 1.3.2),以此得到不同的光强,0、1、2 和 3 层屏蔽下光照的样品和“黑”瓶子应该每种做 3 个。归一化处理的方法如下:在一个液体闪烁

玻璃瓶内直接加入 0.1ml 的示踪用碳酸氢盐溶液, 这个玻璃瓶里还要加入一张过滤过 100ml 冷的浮游植物溶液的  $0.22\mu\text{m}$  (孔径) 的微孔滤膜, 这样一来, 对任何由可以“猝灭” $^{14}\text{C}\beta$  射线所致闪光的藻类色素带进闪烁液的“颜色”都能加以修正。培养时间应在 1—2 h (培养时间从加入放射性碳酸氢盐溶液开始算起, 这个时间应该对所有的样品都相同), 然后将样品放在昏暗的光线下, 并尽快地过滤到  $0.22\mu\text{m}$  的微孔滤膜上, 那些含浮游植物的滤膜必须再用经  $0.22$  或  $0.45\mu\text{m}$  滤膜过滤的样品水淋洗两次, 以便保证留在滤膜上的放射性只是藻类内部所含的。当这些滤膜放在闪烁瓶内用液体闪烁计数器计数时, 在“亮”瓶中由光合作用所摄入的放射性的份额将是:

$$f_L = \frac{\text{培养样品的净计数/分}}{\text{归一化样品的净计数/分}} \times 10 \quad (6-17)$$

因子 10 是由于加入归一化闪烁瓶里的示踪碳酸氢盐溶液是 0.1ml 的缘故, 这个值必须对少量的“暗”摄入进行修正, 于是真正的摄入比是  $f_L - f_D$ , 然后将真正的摄入比画成吸收屏蔽层数目的函数, 以便证明存在着一条随光强增加光合作用逐渐饱和的曲线。

对更有进取心的学生, 可以用参考文献 32 里介绍的技术测量叶绿素的浓度和浮游植物样品的碳酸盐碱性, 如果得到这两个值, 就能规定两个新的参数, 其比值定义为同化数:

$$Z = \frac{\text{每升水摄入的碳的微克数/小时}}{\text{每升水中叶绿素 a 的微克数}} \quad (6-18)$$

利用 50g 碳/1g 叶绿素 a 的比值, 可以估计出浮游植物总的生长速率常数:

$$K = \frac{Z}{50} \text{ h}^{-1} \quad (6-19)$$

(沈 恂译)

# 第7章 光 医 学

John H. Epstein

(加利福尼亚大学医学院皮肤病学系)

7.1	序 言 .....	214
7.2	皮肤的光学特性 .....	214
7.3	日光对皮肤的急性效应 .....	217
7.3.1	晒 斑 .....	217
7.3.2	显微解剖学 .....	220
7.3.3	大分子的合成和有丝分裂 .....	222
7.3.4	DNA修复 .....	223
7.3.5	黑色素的生成 .....	223
7.4	日光对皮肤的慢性效应 .....	226
7.4.1	日光引起的(光化)变性 .....	226
7.4.2	肿瘤的发生 .....	227
7.5	皮肤对日光的有害反应 .....	236
7.5.1	光敏性 .....	236
7.5.2	临床上的问题 .....	241
7.6	日光和人造光的有益效应 .....	244
7.6.1	维生素D的产生 .....	244
7.6.2	皮肤病的治疗 .....	245
7.6.3	全身性疾病(婴幼儿黄疸病)的治疗 .....	249
7.7	光的间接效应 .....	251
7.8	结 论 .....	251

## 7.1 序 言

光生物学的医学方面是这门科学最重要的部分之一，因为它主要涉及非电离辐射对人的直接效应。两个器官系统直接受到太阳光的影响：眼睛和皮肤。对眼睛的影响将在第 10 章中讨论；本章将主要讨论皮肤对太阳光的反应<sup>[1-4]</sup>。

达到地球表面的太阳辐射从紫外区的大约 290nm (或许 288 nm) 到可见区和红外区乃至波长更长的区域。几乎皮肤发生的所有光生物学反应都是由 290(或 288)nm 到 320nm(紫外-B)的辐射引起的。这些波长的辐射抑制有丝分裂、DNA、RNA 和蛋白质的合成；产生维生素 D；诱发皮肤癌；刺激色素产生以及我们称之为“晒斑”的红斑反应。这些波长构成了通常称作的“晒斑谱”。320 到 400nm 之间(紫外-A)的较长波长的紫外线产生较轻的光生物效应，诸如即发性的色素加深(IPD)和即发性的红斑反应；但问题是紫外-A 辐射显著地加重了紫外-B 辐射产生的急性损伤，增加了致癌的可能性。此外，外源性光敏化物质产生的绝大多数反应都是紫外-A 辐射引起的。太阳谱的其他部分对皮肤没有多少特殊的效应，只是红外辐射能产生热烧伤，以及能加强紫外辐射引起的光生物反应。

## 7.2 皮肤的光学特性<sup>[1,2]</sup>

发生光生物反应，必须有三个要素：生物系统、辐射和该生物系统内的辐射吸收体。我们关心的生物系统是皮肤(图 7-1、7-2)；辐射来自太阳；皮肤中吸收辐射的分子，总的来说还有待于鉴别，不过，DNA 似乎是其中一种重要的分子。

如果角质层的死细胞中有一个光敏化分子，那么其作用就很象一块防护性的滤光片。如果这个分子在表皮层的生发层或胚层里，那么吸收合适波长的辐射之后它可能启动一个光反应。很清楚，为了使这种反应发生，辐射一定得穿透皮肤表层并达到这个吸收分子的部位。

皮肤把大量的入射的可见区辐射和近红外区辐射反射掉。白皮肤对这些辐射以及紫外-A 辐射的反射较黑皮肤有效得多。无论哪种颜色的皮肤，对 320nm 以下的紫外辐射的反射都很少。

皮肤的散射和吸收对减弱晒斑辐射所起的作用比皮肤的反射所起的作用还大。角质层的扁平细胞、黑素体、核酸、蛋白质、类脂化合物、组氨酸、尿刊酸、肽、胆固醇等等都通过散

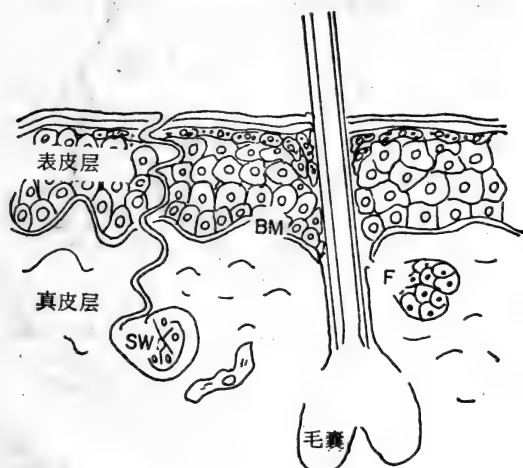


图 7-1 皮肤的结构。皮肤主要包括三层，最外层是表皮层，它通过基膜(BM)与真皮层分开。真皮层主要包括结缔组织、大部分胶原蛋白和一些由纤维细胞产生的弹性组织；真皮层也含有血管和淋巴管、汗腺(SW)、皮脂腺(F)、肌肉和神经。

再下面是脂肪层，图中未画出。

射和吸收来减弱紫外辐射的穿透。

由于短波紫外线在产生光生物反应方面的重要性，人们对这些波长的透射率进行了广泛的研究<sup>[1, 2]</sup>。这些研究所得到的结果彼此不太相同，但有一点是一致的，那就是，在晒斑区或紫外-B区(290—320nm)内的入射辐射，有相当一部分被角质层吸收。白种人的皮肤内，这种辐射至少有 20% 达到了

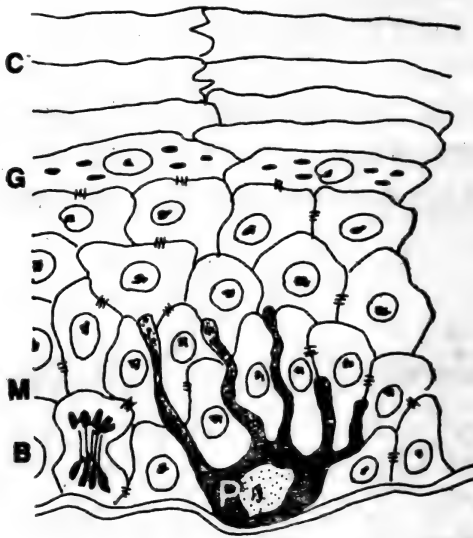


图7-2 表皮层的结构。表皮层包括四层：基底层(B)由单层或双层生发细胞组成，在这里进行着细胞分裂而不断补充表皮；马尔皮基氏层由多棘的细胞(角蛋白细胞)组成，这些细胞之间有桥连接；它们从基底层向外生长，延伸到死去的外角质层。这些马尔皮基氏细胞变成了颗粒层(G)，在颗粒层中形成对角蛋白的生成可能是必需的一些特异性蛋白质。然后，这些细胞失去核，含有大量角蛋白，从而形成防护角质层(C)。最后它们脱落到外环境中。黑色素细胞(P)是树突状的，位于基底层中。它们的树枝状的(臂状的)突伸展到马尔皮基氏层。这些细胞产生黑色素，它们使黑色素通过树突进入马尔皮基氏细胞里。黑色素细胞和与它们相联系的马尔皮基氏细胞组成了表皮层的黑色素单元。



马尔皮基氏细胞(Malpighian cells),大约 10% 穿过表皮而到达上部真皮层。黑色皮肤的角质层,由于有黑色素而吸收了大量的入射辐射的能量。大部分波长较长的紫外线(紫外-A)和可见光穿过表皮被真皮内的光敏化物质吸收。

这种能量的吸收,在生色团中产生了激发态。这种激发态可以通过若干途径退激、包括热衰变或者发射比吸收波长长的光(参阅第 2 章)。皮肤的光敏性反应的启动、或者是通过吸收了能量的分子中的直接变化,或者是这种能量传递到其它分子或细胞组分,如膜、线粒体、核酸等等。

## 7.3 日光对皮肤的急性效应

### 7.3.1 晒斑<sup>[1, 2]</sup>

晒斑是日光引起的最常见的有害效应。皮肤的变化,无论是形态学上肉眼可见的变化还是显微镜下可见的变化,均与引起红斑的辐射的剂量、皮肤黑色的程度以及角质层的厚度直接有关。因为可以设想,即使皮肤中黑色素很多,如果受到足够多的有效波长的照射,皮肤也会发生晒斑。

红斑是最明显可见的一种晒斑反应,它的表现分两个阶段。受照射时出现模糊的红斑,并且很快消失。2—4 h 后出现延迟反应,14—20 h 达到高峰,并持续 24—48 h。最后是死亡的表皮细胞脱落。

日光所致红斑的作用光谱主要在 288 (或 290)nm 和 300 nm 之间(图 7-3)。1934 年由 Coblentz 和 Staiv 得到的标准红斑曲线表明,其最有效的波长是 297nm,效果最小的波长是 280nm 和 320nm。以后的研究得到的结果是,产生红斑的最有效波长的可能范围在 290—294 nm 之间。而 Urbach 及其同事利用效率和有效能量的一些参数,发现最有效的波长大约

为 308 nm (参阅 3.7)。320—400 nm 的辐射能产生轻微的红斑,但照射量需增大 100 倍。然而,紫外-A 辐射能极大地加强紫外-B 辐射引起的红斑 [4-p.131,5]。

由人造光源产生的波长短于紫外-B 区的辐射也可引起红斑。实际上,对产生红斑来说,254nm 的紫外-C 辐射比紫外-B 辐射更有效。虽然不同的研究未得出一致的红斑效应曲线,但有一点是一致的,就是波长为 254 nm 的辐射对产生红斑最有效。随着波长的增加,致红斑效率迅速下降,尤其在 270—280 nm 之间,效率下降得更快。关于这一点有些分歧,相对于 290nm 来说,有些研究者在 270—280nm 处看到效率下降,而另一些研究者在这个波长范围看到的是一个平坦区。随着波长的增加,该曲线继续下降,在 320nm 处趋于零,但并未降为零。波长短于 290nm 的辐射产生的红斑,在外征及潜

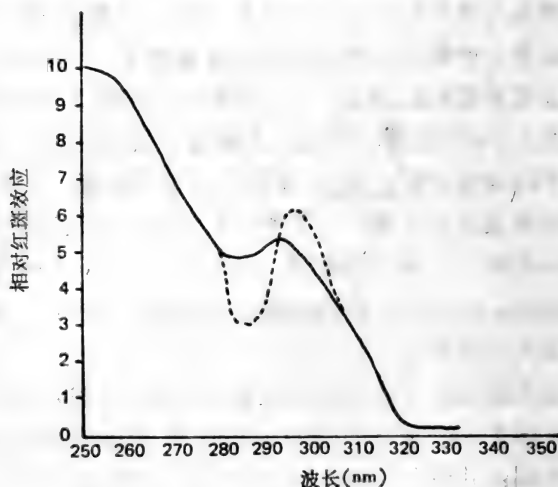


图 7-3 红斑作用光谱。对红斑作用光谱至今未取得完全一致的意见。这个曲线反映了参考文献 1 和 2 中谈到的不同的看法。还不清楚 280nm 附近波长的效应是一低谷(点线)还是一平坦部分(实线)。

伏期方面都不同于紫外-B区产生的反应,也就是说,它是粉红色而不是深红色的,它在8h达到峰值而不是14—20h。因此,它或许表示一种不同的现象。

“晒斑”这个术语代表着主要是由288(或290)nm到320nm波长的辐射引起的若干复杂的皮肤损伤反应。显然,许多变化是同时发生的。此外,很难区分效应是原发性的还是继发性的。目前还不明了吸收光能引起原初光化学反应的生色团的本质。从含有芳香氨基酸的蛋白质的吸收谱及紫外线对这些分子的深刻影响来看,人们认为,这些蛋白质可能就是生色团。不过,若干其它物质,包括核蛋白(DNA和RNA)、咪唑丙烯酸、黑色素、甚至磷脂的不饱和脂肪酸在光能的原初吸收中都可能起作用。类脂的过氧化作用在体内和体外都已被证明。因为溶酶体的膜容易被类脂过氧化物损伤,所以类脂过氧化物的生成可能在紫外线所致的损伤中起重要作用。看来在这个复杂过程中很可能涉及到多种生色团。

晒斑红斑的发病机理受到广泛注意<sup>[1, 2, 4-p. 117, 6, 7]</sup>。不过还未肯定它是一种原发现象还是继发现象。虽然人们认为后者的可能性更大,但已经证明紫外线对上部真皮血管有直接损伤。Van der Leun的研究表明,从250nm到长波紫外区的范围很宽的辐射对血管有直接的效应<sup>[1]</sup>。此外,在320nm附近,作用光谱上出现一个尖锐的峰,它能诱发可扩散的血管扩张物质的产生。

这些现象提出了关于晒斑反应的化学媒介的特性这样一个问题<sup>[4-p. 143]</sup>。积累的证据指出,在哺乳动物组织中最普遍的影响血管的物质之一,组胺,与这个过程无关。另外,尽管受到晒斑辐射后释放出激肽,可能还有5-羟色胺,但它们不象是与这种特有的延迟性的红斑反应有关。最近的研究认为,这种影响血管的媒介是前列腺素<sup>[8]</sup>。不过,为了确定这个看

法是否正确,还需做进一步的工作,因为目前这种看法基本上还是推测性的。

## 7.3.2 显微解剖学

### 7.3.2.1 光学显微镜检查

在紫外线照射后几小时内,人的皮肤在组织学上所见的变化很小。皮肤白皙的人,照射后 24 h 首先可见的变化是表皮马氏层中出现角化不良细胞(晒斑细胞)的病灶。在 48h 内,整个表皮都能观察到损伤:染色异常的(角化不良的)、空泡化的细胞以及皱缩的核。黑色素细胞的树突这时也变得相当明显。再生往往增强,受损伤的细胞在 72 h 时形成一个脱落(死肉)层。这时,表皮层的增生过盛(变厚)非常明显(图 7-4)。96 h 时,对二羟苯丙氨酸(多巴)敏感的黑色素细胞大量增加,树突具有明显的树状分枝。这些黑色素细胞的变化在深色皮肤内也发生,但是角化不良的变化几乎是看不到的,细胞的瓦解也很不明显。

组织化学和生物化学技术揭示了表皮受照射后所发生的许多其它的急性变化<sup>[1, 2, 1-pp. 117, 147]</sup>包括溶酶体膜的变化和破裂,类脂过氧化物形成,许多酶的活性被抑制,硫氢基和二硫化物基团的增加,以及尿刊酸从反式到顺式同分异构体的转化。这后一种变化在分散晒斑的能量上可能起着重要的作用。另外,在照后 12 h,糖原在表皮层基底细胞内积累,可能是为其后的有丝分裂活性的突然增强提供能量。

真皮的变化一般不显著。可见的变化是发生血管扩张,并且在啮齿动物中,早在照后 30 min 就可见到包括多形态核白细胞的炎性浸润,这种浸润在 8—24 h 之间达到高峰<sup>[2]</sup>。在人类皮肤中,这种细胞反应如果有,也是很轻微的。

这种显微变化的作用光谱,主要在紫外-B 区。不过,对于

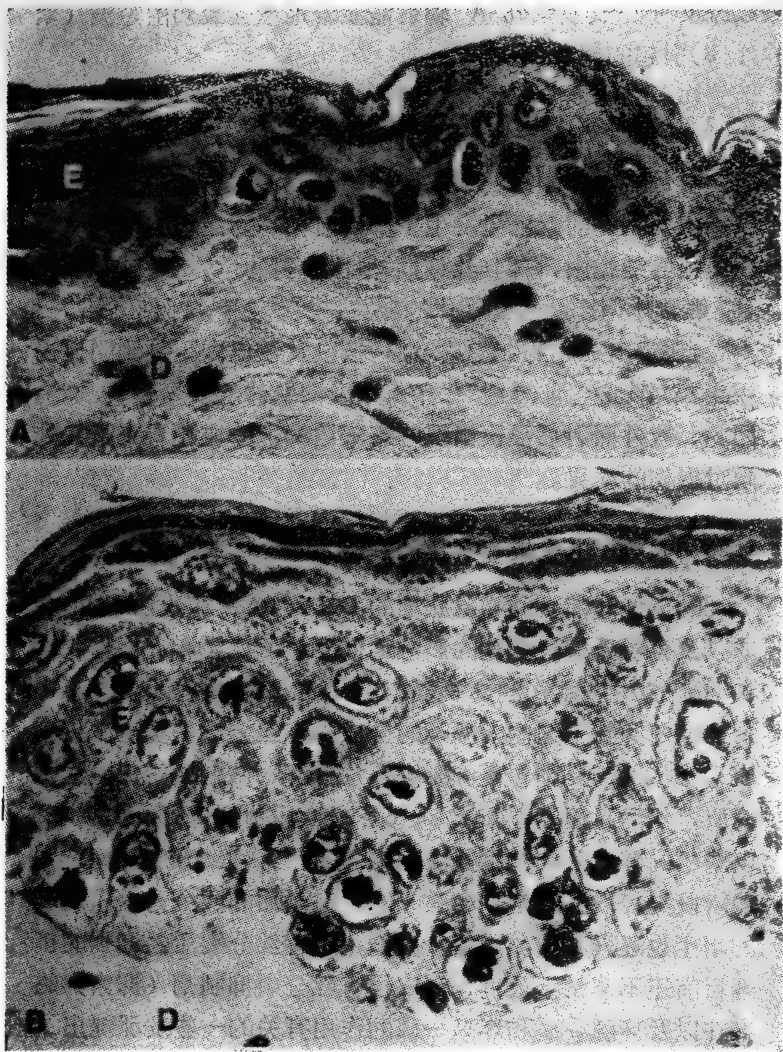


图 7-4 受紫外线照射 72 h 时小鼠的皮肤。(A) 正常的未受照射的无毛小鼠的表皮, 它一般有三个细胞层厚。基底层中有一个有丝分裂。E. 表皮层, D. 真皮层(苏木精-伊红染色;  $\times 600$ ); (B) 显示受紫外线照射后 72 h 时表皮层的增厚, 在基底层中有多个有丝分裂。E. 表皮层, D. 真皮层 (苏木精-伊红染色;  $\times 600$ )(引自参考文献 6)。

红斑反应，长波紫外-A 辐射能显著地增强最初由短波（紫外-B）引起的显微损伤<sup>[9]</sup>。

### 7.3.2.2 电子显微镜检查

电子显微镜的研究表明，结构的变化在它们能用光学显微镜观察到之前就已经发生了。目前见到的最早的变化发生在黑色素细胞内，它们与照射后很快出现的色素变黑现象、微管、黑素体型以及粗丝状体的变化有关<sup>[4-p.195]</sup>。照射后 2—3 小时，在表皮细胞的细胞质、细胞核以及核仁内也见到明显的变化，如形成空泡、丝状体聚集以及溶酶体的明显丧失<sup>[9, 10]</sup>。因此，紫外照射后很快出现的若干结构上的变化看来是几处同时损伤的结果。

### 7.3.3 大分子的合成和有丝分裂

晒斑谱对哺乳动物皮肤中的 DNA、RNA 和蛋白质的合成以及有丝分裂有深刻的影响<sup>[6, 11]</sup>。放射自显影、生物化学和细胞分裂中期停止技术表明，中等红斑剂量在照射后第 1 个小时内抑制了这些大分子的合成和有丝分裂，且至少持续 6 h。到 24 h，功能恢复，接着活力加强，并在 48—72 h 达到峰值，然后又逐渐下降。但是，一次照射后 40 天内，小鼠皮肤中的有丝分裂活性一直是增强的<sup>[12]</sup>。有丝分裂活性增强的阶段与表皮的增生是相联系的，在以后的两个月内，表皮的增生也逐渐减弱。这种表皮增生和有丝分裂活性增强的机理目前还不清楚。最近与表皮层有丝分裂抑制剂（抑素）的存在以及环腺一磷和环鸟一磷的作用有关的一些发现提出了一些有趣的可能性<sup>[13, 14]</sup>。此外，已经鉴别出照射后出现刺激有丝分裂的物质，这说明，这种增生过度是由于抑制作用的消除和生长的刺激合起来的结果。

### 7.3.4 DNA 修复

表皮细胞 DNA 合成的抑制是活体哺乳动物皮肤内发生的最早期的紫外线照射后所发生的现象之一，这与在人工培养的哺乳动物细胞中所见到的现象类似。在可能发生的损伤中，主要在相邻的胸腺嘧啶碱基之间形成的嘧啶二聚体受到人们格外注意。细菌中 DNA 的碱基损伤的修复一般有三种机制：光复活、切除修复和复制后修复（参阅 5.4）。在哺乳动物细胞中，切除修复似乎是主要机制<sup>[15, 16]</sup>。人们用放射自显影（图 7-5）、密度梯度和色谱技术证明了日光和人造紫外线可以引起胸腺嘧啶的二聚作用。通过切除二聚体并用正常的碱基按正确的序列替换它们可以使 DNA 修复。这种损伤和修复发生在活体和离体的表皮中以及细胞培养系统中。人类光敏性疾病，着色性干皮症的特点是没有这种修复系统。这个发现为评价人类皮肤中这种修复系统的重要性提供了一个模型<sup>[4-p.299]</sup>。令人感兴趣的是，在切除修复方面有缺陷的细菌，不仅对紫外线的致死效应更敏感，而且受照射后突变数目增加。患有着色性干皮症的病人对光敏感的主要问题是他们对日光致癌效应异常敏感。这种疾病是否代表了细胞的突变尚待确定。

人工培养的小鼠 L 细胞的复制后修复明显地取决于全程合成而不是复合机制<sup>[4-p.91, 17]</sup>。Lehman 最近的研究指出，在患有着色性干皮症（XP 变异）的四名患者的培养细胞中，没有这种修复机制<sup>[18]</sup>。

### 7.3.5 黑色素的生成<sup>[1, 2, 4-pp.165, 195]</sup>

黑色素是黑色或褐黄色的色素。它们似乎是各种氧化水平上多巴-醌、5, 6-二羟吡咯和 5, 6-二羟吡咯-2-羧酸由

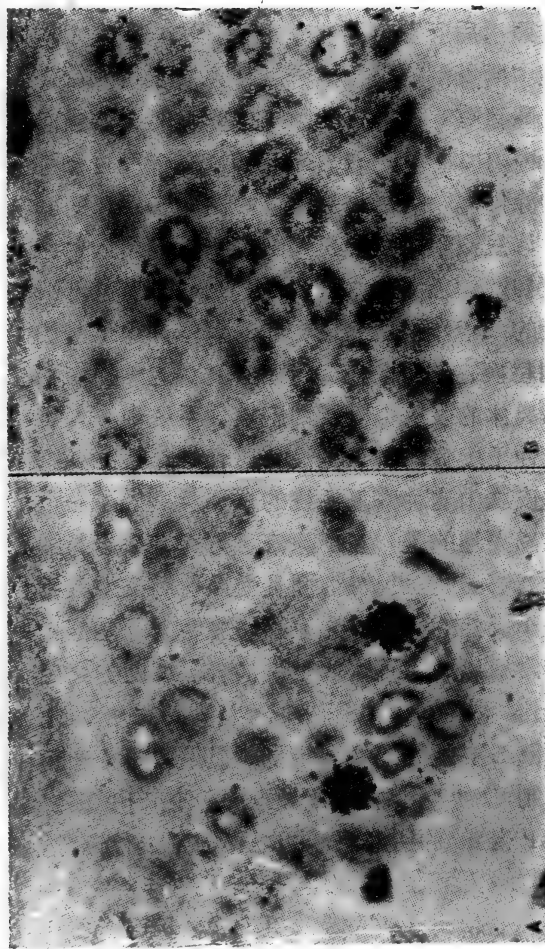


图 7-5 照射后 15 分钟 DNA 的修复。(A)用氚标记的胸腺嘧啶 ( $^3\text{H-TdR}$ ) 作放射性示踪物的放射自显影图。该图表示未受紫外线照射的人的表皮,图中,标记(黑点)致密地集中在二个基底细胞上,这表示有丝分裂前的半存性 DNA 合成(苏木精-伊红染色;  $\times 720$ ); (B)用  $^3\text{H-TdR}$  作放射性示踪物进行标记的紫外照射后 15 分钟人的皮肤的放射性自显影图。所有表皮细胞核都可见到稀疏的标记图形。这种稀疏的标记表示有不按预定程序进行的 DNA 合成或修复复制。这种修复在着色性干皮症患者的皮肤中不存在或者很不明显。在照射后的正常人的皮肤中,上部真皮层纤维细胞和血管内皮细胞表现的这种非预定性 DNA 合成,给出了晒斑射线穿透到上部真皮层可见的证据(苏木精-伊红染色;  $\times 720$ )。



各种类型的键结合在一起的复合多聚物。哺乳动物皮肤中的这种色素是在一些特异细胞(黑色素细胞)中由酪氨酸和多巴酶促产生。光能既可使色素立即变黑,又可刺激新色素生成。

色素的立刻黑化在形态学上的特点是受到 320—700nm 光的照射后几乎立即发生的皮肤变黑。它可能是由于已经存在于表皮黑色素细胞中的还原的或部分还原的黑色素的氧化引起的(参看图7-2)。照射后 1—2 h, 这种现象达到高峰, 而到照后 3—24 h 又减弱了。电子显微镜的研究说明, 色素的立即黑化与下面两种情况有关: 在微管和微丝的主动运动的力的作用下黑素体向树突末端分布和在不太影响黑素体特性的情况下把它们明显地转移到马尔皮基氏细胞中去。在合成新的黑素体所必需的生黑色素的细胞器中没有任何明显的变化。

新的黑色素形成(延迟的皮肤晒黑)在形态学上的特点是照射后 48—72 h 皮肤开始出现褐色的色素。到 13—21 天, 这种现象达到高峰, 然后在以后几个月逐渐减弱。这种反应的作用光谱主要落在晒斑区(290—320nm)。然而, 如果供给足够的能量, 长波紫外和可见光(至少达到 700nm)也能引起新的色素形成。250—280nm 的紫外线对产生新的黑色素也不是很有效的。光学显微镜和电子显微镜结合生物化学的研究指出, 这种新的色素生成发生在叫做黑素体的胞质细胞器的内部或表面; 这些细胞器是在表皮黑色素细胞内形成的。随后, 有色素的黑素体转移到角蛋白细胞, 它与黑色素细胞共同组成表皮黑色素单元(见图 7-2)。然后, 色素被带到角质层, 造成明显的色素过量。这种新的色素沉着对防止日光引起皮肤损伤提供了最有效的天然屏障。

在“延迟变黑”中, 皮肤色素沉着过度与下列变化有关:

①黑色素细胞的增殖和休眠状态的黑色素细胞的活化; ②黑

色素细胞的过度增大以及树突的分枝增加；③黑素体合成的增加；④黑素体的黑化速率增加；⑤黑素体向角蛋白细胞的转移增加，这与角蛋白细胞的转换增加有关；⑥黑素体复合体的大小增加（在高加索人和蒙古人中更加明显）；⑦通过直接影响表皮中抑制酪氨酸酶的（硫氢基）化合物使酪氨酸酶活化<sup>[4-p1.69]</sup>。

## 7.4 日光对皮肤的慢性效应<sup>[1,2,17]</sup>

### 7.4.1 日光引起的（光化）变性

白种人的皮肤被反复照射多年后就会发生很大变化，包括起皱纹、萎缩、出现颜色加深或变浅的斑点、血管扩张、出现黄色凸起部位以及光化角化病。在颈后部，尤其是皮肤白嫩的人，如果受到太阳的大量照射，如农夫和水手，可以看到皮肤发生明显皱褶的变化。

组织学上，在受太阳照射而发生慢性损伤的人类皮肤中，可见到网嵴（表皮的向下突起，图 7-1）的缩短或变平、表皮可能变薄，以及出现许多不规则排列的异常细胞。虽然黑色素细胞的绝对数目一般仍维持不变，但它们的大小、分布以及酪氨酸酶的含量有很大变化。此外，在基底部的黑色素细胞中，在它们的大小和形成黑色素的活性方面与正常皮肤有很大不同。在慢性太阳损伤部位，色素从黑色素细胞向角蛋白细胞的转移似乎也减弱了<sup>[19]</sup>。

在受控制的条件下反复照射无毛小鼠的皮肤后会出现更为明显的变化<sup>[20]</sup>。如所有的表皮层和表皮-真皮基底膜明显变厚（图 7-6）。此外，处于 DNA 合成和有丝分裂状态中的基底细胞的数目增加，细胞通过表皮层的时间缩短。

当这种可见的相对有限的表皮变化成对照，人的皮肤中

发生与日光所引起的变性相联系的深刻的真皮层的变化。在真皮层的上部发生进行性变性。这些特殊的变化包括血管扩张加剧、酸性粘多糖累积和纤维细胞异常,成熟的胶原蛋白减少(但可溶成分增加),以及弹性组织的明显增加和变性(光化弹性组织变性)。光化弹性组织变性,慢性日光损伤引起的结缔组织的这个最重要最明显的变化是一种进行性过程,这种变化在十几岁的童年时代就能见到<sup>(4-p.157)</sup>。最早的变化似乎是弹性纤维数目的单纯增加;接着的变化是纤维的变粗、卷曲和分叉增多,最后取代了真皮,以及结缔组织瓦解成无定型的团块。虽然关于染色情况象弹性组织的那些纤维的起源可能仍然存在着某些疑问,但生物化学和电子显微镜的研究已经肯定,光化弹性组织变性是由于弹性组织的积累。

使实验动物产生弹性组织变性的作用光谱在晒斑区。有人认为,这种结缔组织的变化是成纤维细胞受紫外线照射在功能上发生的光化学变化,而不是结缔组织成分的变性<sup>[1]</sup>。这种假说的证据是,人的皮肤在波长短于 320nm 的紫外线照射后几分钟内就能观察到真皮层内结缔组织细胞 DNA 的直接损伤<sup>[2]</sup>。因此,产生晒斑的这种辐射很可能在日光对真皮结缔组织的慢性损伤中起重要作用。较长的波长是否也有明显的影响目前只能进行猜测。

## **7.4.2 肿瘤的发生**

### **7.4.2.1 人类皮肤癌的发生**

直接用实验验证太阳在人类皮肤癌的生成中的作用是不可能的。不过,大量的观察经验有力地说明光能在诱发这些肿瘤的病因学中所起的作用。白种人的皮肤癌在日照率最高(也就是接受太阳辐射量最大)的地理区域以及在接受照射最多的人(也就是那些户外工作的人)之中一般发病率高。在黑

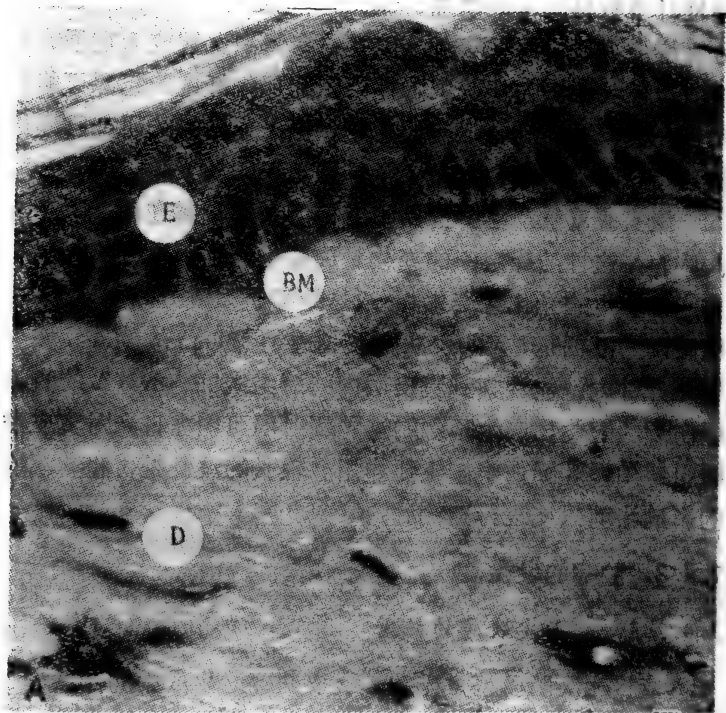
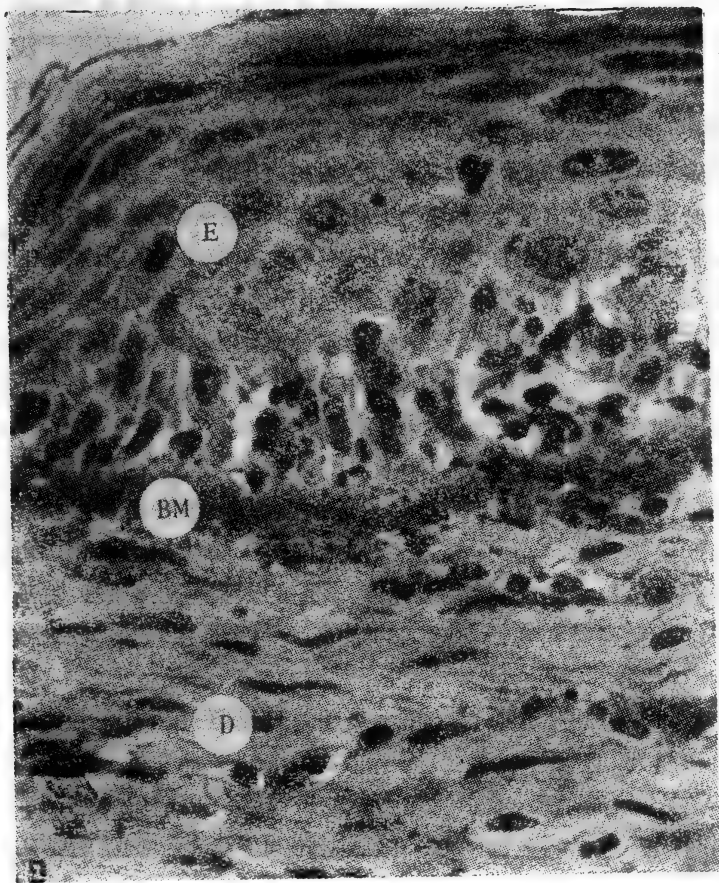


图 7-6 长期紫外线照射对小鼠皮肤的影响。(A) 无毛小鼠呈现有规则的、缓慢的增生,基膜(BM)呈中度的、有规则的变(×600); (B) 无毛小鼠的皮肤受紫外线反复照射四个月后呈极性以及染色质形状的异常,基膜显著增厚和皱缩,有几处已



的皮肤受紫外线反复照射一个月后,发生良性增生过度,表皮厚,真皮变厚。E. 表皮层, D. 真皮层 (苏木精-伊红染色, 现亚恶性到恶性的改变。它的特点是基底细胞的大小、形状、变成不连续的了(苏木精-伊红染色:  $\times 600$ ) (选自文献 23)。

人以及其它深肤色人种中,他们防御紫外线损伤的能力最强,因此,皮肤癌的发病率比较低。此外,肤色最淡的人种,如苏格兰、爱尔兰血统的人,当他们住在紫外线辐射强的地理区域时,似乎最容易产生皮肤癌。如果皮肤癌是在深肤色人种中发生,则肿瘤主要不是按阳光照射的区域分布,这点不同于浅色皮肤人种中的情况。在深肤色的人中,肿瘤的产生往往与受其它形式创伤的刺激有关:患慢性腿部溃疡或因不穿鞋、使用康格律(一种充满炭火的陶罐,捆在腹部取暖)、缠腰布等,容易使受刺激的皮肤部位产生肿瘤。与此相反,皮肤癌在斑图皮肤变白症和着色性干皮症的人中的分布取决于太阳照射的方式。支持日光在皮肤癌生成中起作用这个论点的论据可概括如下:①皮肤癌主要发生在身体曝露于阳光照射的部分;②受到阳光照射多的地区皮肤癌发病率高;③深肤色的人不如白种人那么容易产生皮肤癌。

尽管这些论点不能构成绝对的证据,况且它们本身还不完全肯定,但有相当多的偶然的证据说明,至少在三种皮肤癌的产生中日光起作用:基底细胞上皮癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤。最普遍的皮肤癌(因此,最普遍的人类恶性肿瘤),即基底细胞上皮癌和鳞状细胞癌的形成,受四种主要因素的影响<sup>[4-p.259]</sup>。

(1) 总的阳光照射时间。长期受日光照射,象在得克萨斯和澳大利亚那样,在皮肤癌的发生中似乎是个重要因素。不过,比较高尔韦、爱尔兰和费城的皮肤癌发生情况说明,照射时间并未说明全部问题。总照射时间少得多的费城所发生的癌就是一例。

(2) 日光中紫外成分的强度和照射时间。最近的研究指出,更精确地讲,皮肤癌的产生与引起红斑的辐射(290—320nm)的照射时间的关系比总的阳光照射时间更密切。根据

这种观点,在总光照多得多的高尔韦农村地区的癌症发生与总光照时间少的费城市区癌症发生却相似,这种现象就容易理解了。受晒斑谱的照射最多的时间在高尔韦可能是 1.33 月/年,在费城是 4 月/年(如果人们在有光照的时间内连续在户外的话)。这样,费城和高尔韦这两组皮肤癌的“有效”照射时间就比较相似了。

(3) 遗传素质。着色性干皮症是遗传素质对皮肤癌形成有影响的最有说服力的例子<sup>(4-p.299)</sup>。在不能修复紫外线损伤的 DNA 的人中,所有各种阳光诱发的恶性肿瘤通常在 20 岁之内发生。不过,遗传素质也似乎影响一般人群中基底细胞癌和鳞状细胞癌的产生。许多研究指出,这些癌症与淡眼色、淡肤色、淡发色、不易晒黑,容易发生晒斑以及反复的晒斑反应史之间有明显的联系。此外,凯尔特血统的人比其它淡肤色的人更容易产生这种肿瘤。

(4) 与阳光无关的因素。受有效致红斑波长的阳光照射似乎是产生皮肤恶性肿瘤的主要因素。鳞状细胞癌似乎与太阳照射有直接关系。不过,最普遍的皮肤癌,基底细胞上皮癌的形态学的分布指出,其它因素也肯定起作用。约三分之一的基底细胞上皮癌发生在受到阳光照射最少的皮肤部位。因此,尽管阳光似乎是产生肿瘤的突出因素,但肯定有尚未确定的其它因素存在。

黑色素瘤是一种最可怕的皮肤癌。与基底细胞癌和鳞状细胞癌不同,这种癌很容易转移到体内其他器官,死亡率也比较高。幸运的是,它们不常见。与那二种常见的恶性肿瘤不同,日光对黑色素瘤发生的作用还不够清楚<sup>[23]</sup>。黑色素瘤主要的发病区不是受日光照射多的区域;黑色素对产生黑色素瘤的防护效应不像它在其他皮肤癌中那么明显。不过,许多调查说明,至少对这些恶性肿瘤中的某一些,阳光的确影响它们

的发生发展。从统计上看,患有黑色素瘤的白种人与未患黑色素瘤的对照组的人相比,往往是淡眼色、淡发色、皮肤白皙以及在户外的时间较多。这种癌症的地理分布调查表明,即使在遗传学上相近的人群中,日晒多的人较日晒少的人产生黑色素瘤的要多得多。太阳辐射在着色性干皮症患者中引起黑色素瘤以及慢性紫外辐射能使实验动物从良性色素损伤产生黑色素瘤,这些事实进一步证实了阳光在合适的条件下能促进这些肿瘤的发生。另外,从限界性癌前黑变病发展而来的黑色素瘤的分布有力地说明,阳光至少部分地与这些损伤有关。然而,黑色素瘤解剖部位的分布指出,在这些肿瘤的疾病学中,其它一些因素比阳光更重要。

#### 7.4.2.2 肿瘤的实验发生

##### 7.4.2.2a 定量研究

通常用白化病小鼠耳朵的皮肤,偶而也用白化病大鼠耳朵的皮肤作为用紫外辐射产生肿瘤实验的实验对象,因为这部分皮肤没有三种主要的天然防御因素:色素、厚角质层和密实的毛。在这种组织中产生的肿瘤,主要是肉瘤,对 Blum 及其同事所完成的具有历史意义的定量研究它是非常适用的<sup>[22]</sup>。用纯系白化病有毛小鼠的耳朵为材料,以主辐射为 320 nm 以下波长的紫外源照射,他们证明,就剂量-生长率的关系而言,癌的生长期遵循反比规律。增加剂量或缩短照光之间的间隔,都加速肿瘤的产生,但不改变发病率曲线的形状。

目前还未阐明的紫外线产生皮肤癌的一个因素是日照剂量的加大对反比规律的影响。在阐述化学药品、作用谱等的影响时,不同实验者所采用的照射时间从几秒钟到几小时不等。目前所发表的资料还没能说明,如果一定的照射量在几秒钟内或者减弱在几小时内给出,两种情况下皮肤癌的发病



率是否相同。

对条件加以控制,使在足够长的时间内给出足够的能量,则将产生皮肤癌<sup>[22]</sup>。然而,如果能量作用时间不够长,那么无论多少能量也不产生肿瘤。Blum 推测,紫外线诱导癌的产生是一种从最初照射开始的连续过程。在动物的寿命期内出现肿瘤是和动物生长过程的充分加速有关系的。已有报道,一次紫外照射后再用巴豆油刺激,能在无毛小鼠的皮肤上产生鳞状细胞癌;这个事实支持了生长加速是产生肿瘤的一种重要因素这个观点<sup>[23]</sup>。

肿瘤生长加速的机制仍待阐明。促有丝分裂物质的产生,或许更重要的,有丝分裂抑制剂、抑素的排除,可能在这个过程中起作用。

#### 7.4.2.2b 定性研究<sup>[4-p.259,20,23]</sup>

用无毛小鼠的皮肤研究了紫外线引起的上皮癌发展期间组织中发生的进行性变化;这些肿瘤与日光在人类皮肤中诱发的主要肿瘤是一样的。另外,这些动物被证明在研究紫外线对黑色素瘤形成的影响中是有用的<sup>[23]</sup>。

许多研究者认为,在上皮癌的发生中,真皮的影响是最重要的。过去一直认为,光化弹性组织变性是这种疾病进程中的一个可怕的中间阶段;不过,最近的几项研究表明,这种变化在人和实验动物身上都是不重要的<sup>[20, 23]</sup>。许多研究者相信,下述变化中的某些或全部可能与真皮对表皮恶性肿瘤发生的重要影响有联系:弹性组织和胶原蛋白的分解;幼稚胶原蛋白的增生;酸性粘多糖、肥大细胞或成纤维细胞的积累;新的弹性组织的形成以及真皮血管的改变。

用来观察解剖学变化和细胞动力学的组织化学和同位素(<sup>3</sup>H 胸腺嘧啶)示踪技术展示了在无毛小鼠种系中从良性增生经过光角化病到症状明显的侵袭性恶性肿瘤的渐进发展过

程。这些研究表明了上部真皮层中酸性粘多糖的积累、不溶性胶原蛋白的消失以及肥大细胞和成纤维细胞的增殖。最明显的反应出现在表皮-真皮层基膜中(图 7-6),在基膜上,这种构造的进行性变厚伴随着表皮的过度增生。随着不规则和异常的表皮细胞的增殖,基膜表现出增厚、不规则、皱缩和散离,而在症状明显的侵袭性恶性肿瘤中,基膜全然消失。在人类皮肤癌和化学诱发实验性肿瘤中,在基膜上也见到类似的破坏。电子显微镜观察指出,穿过基底层的细胞的显微投影可以反映肿瘤发生最早阶段的变化。

表皮细胞动力学的研究表明,合成 DNA 和进行分裂的萌发的基底细胞的数目不断增加,DNA 合成时间以及与表皮变化有关的 G2 期缩短<sup>[20]</sup>。同时,尽管表皮厚度增加,但细胞通过表皮的过渡时间不断减少。对于症状明显的恶性肿瘤,萌发细胞层消失,许多外表异常的有丝分裂在整个肿瘤中存在。因此,致癌过程的特点是细胞产生、成熟和周转的加快。还有,表皮萌发基底细胞看来是异常增殖的主要部位或初始部位。

在实验上,已经用短于 320nm 的辐射在无毛小鼠的皮肤中使良性色素瘤转化成恶性黑色素瘤<sup>[21]</sup>。反复照射几个月,产生了在组织学、放射自显影和电子显微镜观察上具有恶性肿瘤特征的大量的侵袭性黑色素细胞瘤。此外,其中的一些转移到局部淋巴结。这些结果指出,在实验动物身上,良性色素疾病可以由紫外辐射转化成恶性瘤。在人类皮肤中是否发生类似的过程仍有待于研究。

热对皮肤损伤程度的增强效应和对紫外线引起的红斑反应强度的增强效应的影响已经有详细记载<sup>[21]</sup>。还有,已经证明,在紫外照射时升高温度将加速肿瘤的产生。临床经验也证明,事实上,热确实加剧了紫外线引起人的皮肤癌。

我们生活环境中存在的致癌和促肿瘤化学物质所产生的

效应已经使我们认识了化学物质对紫外线引起的一些重要致癌过程的影响<sup>[23]</sup>。最近的研究表明，紫外辐射和化学致癌物的作用是相加的。此外，反复使用非致癌物巴豆油能在一次紫外线照射后引起恶性肿瘤。这些实验说明，环境的化学物质在皮肤肿瘤的发生中可能是一种重要的因素。

或许，紫外线诱发癌的问题最使人感兴趣的是急性反应与最终的生癌之间的关系<sup>[7, 15, 22, 23]</sup>。只有当急性光害性红斑也产生时才出现光诱发癌。巴豆油实验还指出，紫外线致癌的过程是从最初的照射开始的。但是，导致癌的生成的早期变化仍未搞清。许多研究表明：紫外线和化学致癌物对哺乳动物表皮的某些重要功能(包括 DNA 和 RNA 的合成, 细胞转变和有丝分裂速度)的影响是类似的但并不完全相同。至今



图 7-7 着色性干皮症。患有着色性干皮症的病人的临床照片，照片显示光化损伤的皮肤，多发性光化角化病以及肿瘤。

最令人感兴趣的发现是从 DNA 修复系统和不常见的遗传疾病着色性干皮病的研究得到的, 它们把急性光损伤与癌的产生联系了起来。正如在 7.3.4 中所看到的, 在这种疾病中, 光敏性表现为日光很容易诱发皮肤癌<sup>[4-P.299, 17]</sup> (图 7-7)。这些病人的细胞, 没有修复紫外损伤的 DNA 的能力。组织培养的着色性干皮症病人的细胞受紫外线照射后与正常人细胞相比也有较高的突变率<sup>[24]</sup>。人们估计这种缺陷可能导致在日光照射后产生较高的突变率, 从而引起癌的产生。

## 7.5 皮肤对日光的有害反应<sup>[2,7,25]</sup>

日光对皮肤的大多数效应都是有害的。我们在下面将对这种能量的某些有害效应的致病过程予以解释。这些解释难免是粗糙的, 因为目前我们在这方面的知识是有限的。

### 7.5.1 光敏性

光敏性是一个广义的术语, 用来描述日光或人造光能量的有害反应。可能发生两种光敏反应, 其性质可能是光有害的也可能是光变态反应性的。

#### 7.5.1.1 光害性<sup>[25]</sup>

我们可以把光所引起的与过敏机制无关的皮肤损伤看做是光有害。从理论上讲, 如果皮肤受到适宜波长的足够光能的照射, 并有足够的分子吸收这种波长的话, 这些反应能在每个人身上发生。当然, 晒斑辐射必须穿透表皮到达这些为使反应发生的分子上。晒斑反应是光有害反应的一个经典例子。临床上, 光有害反应往往表现为红斑, 有时表现为水肿 (肿胀), 这些症状都是在照后几分钟到几小时内出现的。随后在照射部位出现色素沉着过度 and 脱皮 (皮肤剥落) (图 7-8)。

组织学上, 当光敏化剂在表皮层内时, 表皮细胞变性可能

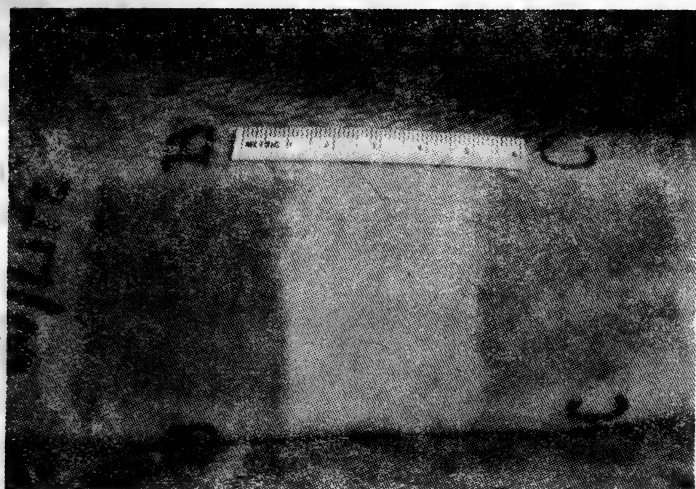


图7-8 光有害反应。在前臂的两个区域B和C上，由于局部施用呋喃香豆素后受到该化合物作用光谱（320—400nm 之间）的紫外线照射而发生的光有害反应。它的特征是出现红斑和水肿。B和C之间的部位也受紫外照射，但预先没施用呋喃香豆素化合物。

是明显的。在使用外源性光敏化剂于皮肤后，这点是最明显的。可以看到真皮层内有轻度到中度炎性细胞渗入的水肿，它们主要由多形核的白细胞组成(图 7-9)。

尽管进行了大量的研究，发生光害反应的机制并不很了解。在使用外源性光敏化剂的情况下，要么是分子本身，要么是光敏化剂与细胞器的复合物被吸收的光所激发。于是可能形成三线态或自由基；这种能量的耗散可以造成若干变化，包括过氧化物的形成、细胞膜或溶酶体膜的损伤以及核或线粒体的损伤。

损伤机制很可能随光敏化剂而异。有证据支持这种观点，即呋喃香豆素导致的光损害(见图 4-3)是和这种药物与DNA形成加成物有关的。氯普马嗪看来主要与RNA形

成类似的加成物。其它化学光敏化剂，如亚甲基蓝、吖啶黄、玫瑰红和卟啉需要有氧存在。化学光敏化剂引起的这类光损害叫作“光氧化敏化作用”(参阅第4章)。

#### 7.5.1.2 光变态反应<sup>[25]</sup>

光变态反应可以定义为皮肤为了对单一因素的光能或存在光敏化剂时对光能作出反应的一种应变能力，这里所指的

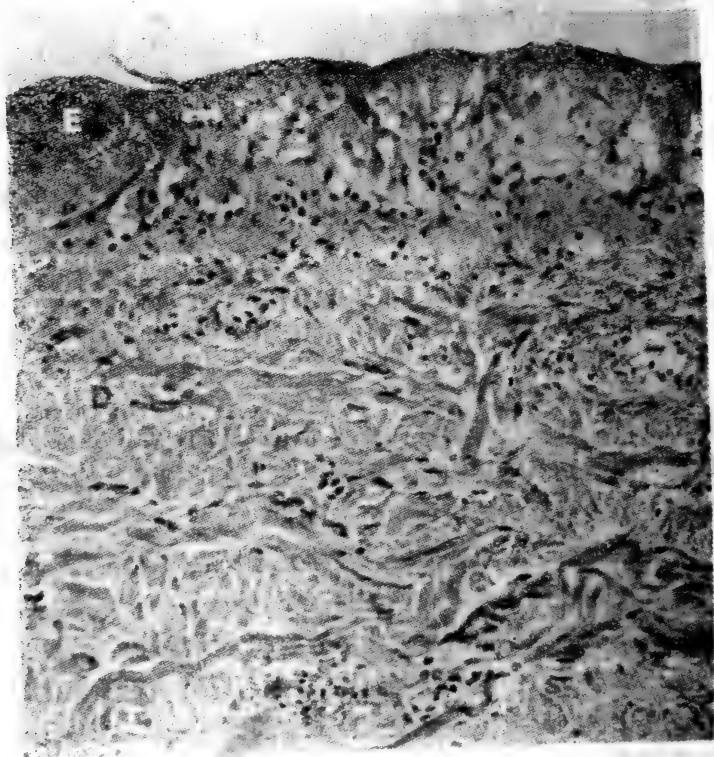


图 7-9 光有害反应的组织学图。该图是图 7-8 所表示的光害反应的活组织检查，显示表皮层的明显破坏：细胞内和细胞外的水肿（肿胀）、产生空泡乃至细胞死亡。真皮层内显示很少的细胞浸润。E. 表皮层；D. 真皮层（苏木精-伊红染色； $\times 50$ ）(引自参考文献7)。

光敏化剂多半依赖于循环抗体的产生或者以细胞为中介体的免疫应答。这些反应不常见，临床症状是从即发性的荨麻疹反应(图 7-10) 到延迟性的发痒、鳞屑剥落或渗水(图 7-11)。疹子常常扩展到受照射区域之外，在远处的以前发生过疹子的部位也可能再发生。在人为控制条件下，通过测定潜伏期、皮肤自发发红和这一过程向正常部位的蔓延，可以了解过敏反应的特征。通常，与光害反应相比，有同样作用谱的较少的辐射能就能引起光变态反应。

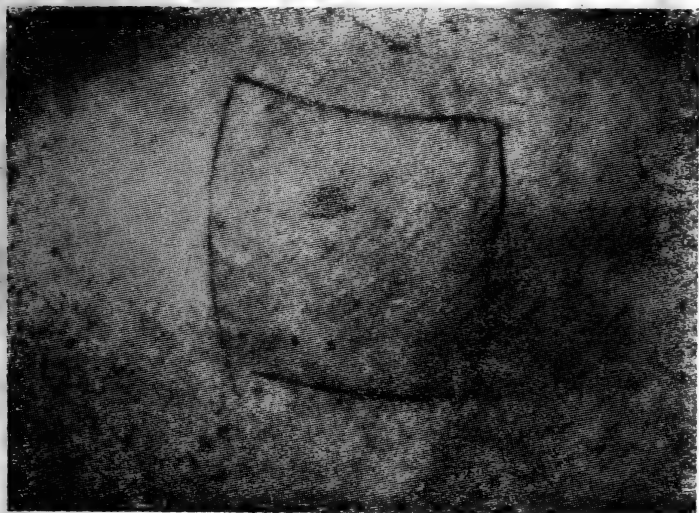


图 7-10 日光荨麻疹。紫外线照射后很快出现的荨麻疹水泡(疹子)的临床照片；在 30 分钟内消退(引自参考文献 2)。

在组织学上，光变态反应不同于光害性。即发性的荨麻疹(疹子)的损伤在光学显微镜下是很小的，只有一些水肿和血管扩张。延迟性反应表现出在真皮层血管周围出现密集的环形的细胞浸润，虽然这种环形的细胞浸润不是这些反应的诊断指标，但却是这些反应的特点(图 7-12)。与光害性类似，无论有或没有已知的外源光敏化剂的存在，都能产生光变



态反应。



图 7-11 光过敏接触性皮炎。使用含有三溴柳酸苯胺的肥皂并用其作用光谱(320—400nm 的紫外线)照射所引起的湿疹型光过敏接触性皮炎的临床照片。



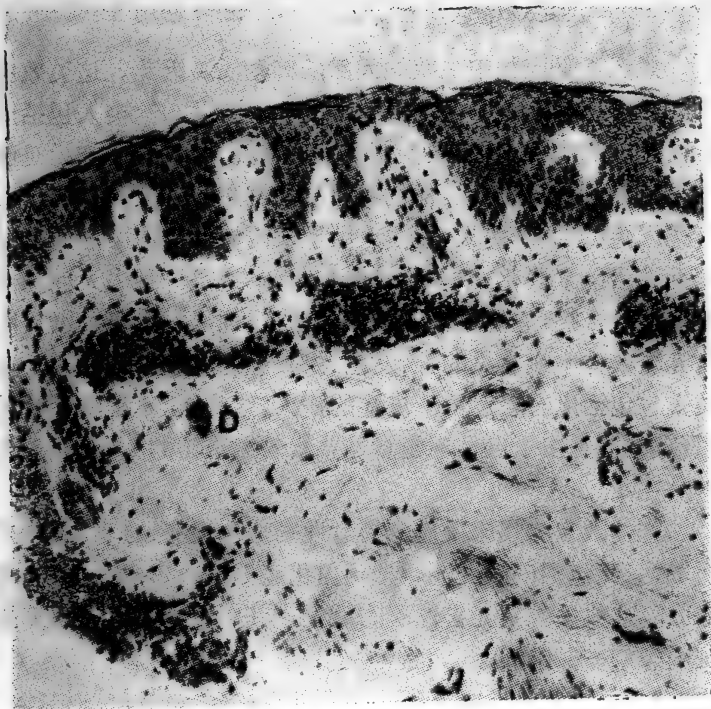


图 7-12 光过敏接触性皮炎的组织学图。光接触过敏反应的组织学检查图显示，在真皮层血管周围有密集细胞浸润（真皮层中的密集黑点），这是延迟的过敏反应的特点。E. 表皮层；D. 真皮层。（苏木精-伊红染色； $\times 80$ ）（引自文献 7）。

### 7.5.2 临床上的问题

关于临床反应问题本章不准备详细叙述，它们主要属于皮肤病学的领域。不过，概述一下这些反应也许对于正确看待光能的医学效应是有用的。有害的临床效应可以分为三大类：①因缺少或没有防护而发生的反应；②因光敏化物质的存在而引起的反应；③不是由于缺少防护或存在已知的光敏化剂而发生的反应。

### 7.5.2.1 防御的缺乏或丧失<sup>[2,7]</sup>

黑色素是皮肤中主要的天然防御物质。因此,这类效应的几乎所有临床问题都与黑色素的缺乏有关。这类人包括患有白化病的病人,他们缺少酪氨酸酶系统,因此不能产生足够的黑色素;白癜风病人,他们没有色素细胞,因此没有黑色素;苯酮尿症(PKU)病人,这些人由于苯丙氨酸代谢中的遗传缺陷而发生色素淡化;Chidiak-Higashi病,这是一种先天性的色素淡化综合病,它显然是由于黑素体结构的异常所致;以及所有光敏条件中最常见的,淡发色、淡眼色的皮肤白皙的人。这类人也包括患有着色性干皮症的病人,这些人,不是由于缺乏黑色素,而是由于自身不能修复被紫外线损伤的DNA而致病(图7-7)。

这类效应的临床反应包括急性晒斑和慢性的不断的损伤,后者又包括皮肤变性,光化角化病(图7-13)和皮肤癌的形成。这些反应是光害性质的反应,其作用光谱落在晒斑范围内(290—320nm)。

### 7.5.2.2 光敏化反应

本节中讨论的光敏化剂是这样一些物质,即它们吸收太阳能后,在皮肤中产生一些有害的反应。这些光敏化物质就其来源可以是内源性的或外源性的。

卟啉是人体内产生的唯一搞清楚的光敏化物质。它们是吡咯环结构,这种结构对全身的细胞代谢是至关重要的。此外,血红蛋白的血红素部分是由这些分子形成的。然而,在患吡咯紫质沉着病的病人中,大量的卟啉是在骨髓和肝组织中产生的。在这些情况下,卟啉不与铁结合,它是强有力的光敏化物质。因此,它们使皮肤发生从皮肤和它下面组织的明显破坏到单纯的色素增生变化。变化的程度与太阳的照射和可利用的卟啉分子的数量有关。皮肤的这种变化是由于光氧化

敏化的光害反应引起的，其作用光谱的峰值在 400nm 附近。

外源性光敏物质可以通过局部使用(接触)或通过血液循环(全身的)到达皮肤。

(1) 局部的化学药剂可以有意地引起一些光敏反应(如像在治疗牛皮癣和白癜风时使用焦油和补骨脂素时发生的那样,见图 4-3),或者无意地引起一些光敏反应(如像使用植物和香料中的补骨脂素分子、除臭皂、磺胺药及酚噻嗪药物中的卤代柳酸苯胺等时所发生的那样)<sup>[2,7]</sup>。这些反应常常是光害性的,但偶而是光变态反应性的。作用光谱通常在 320—400 的范围。

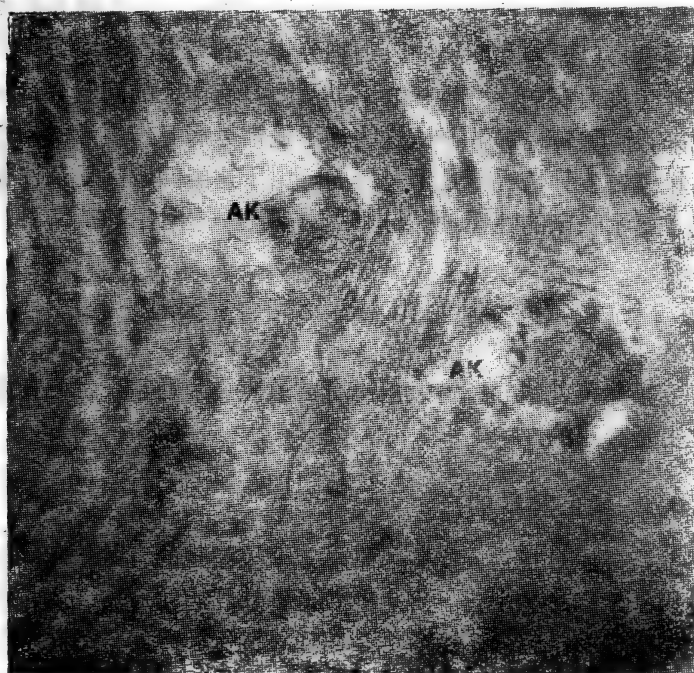


图 7-13 慢性日光(光化)损伤。光角化病患者手背的慢性光化损伤(AK)。

(2) 全身的化学药物也可以有意地引起光敏性反应,例如,像在使用补骨脂素化合物治疗白癜风和牛皮癣时发生的那样,或者无意地引起光敏性反应。而后者是常见的情况。这种出乎意料的光反应一般是由通常使用的药物引起,如抗菌磺胺药、噻嗪利尿剂、磺酰基脲抗糖尿病药物、酚噻嗪以及广谱抗菌素、去甲基氯四环素<sup>[2, 7]</sup>。绝大多数本质上是光有害的,尽管偶而可发生延迟的过敏反应。光害性反应和光变态反应的作用光谱常常包括长波紫外辐射。

#### 7.5.2.3 防御系统正常且不存在已知的光敏化物质的情况

不是由于缺乏防护也不是由于存在已知的光敏化物质而发生的光反应包括许多情况,如即发性的以抗体为媒介的太阳荨麻疹(疹子)和明显的以细胞为媒介的多形态光疹,某些自身免疫性疾病,维生素缺乏以及许多遗传上的问题。一般说来,除了多形态光疹外,这些都不是常见病。作用光谱和作用机理在各种情况下是不一样的。由于这类问题的复杂性和基本属于临床的性质,所以这里不打算进一步讨论它<sup>[2, 7]</sup>。

## 7.6 日光和人造光的有益效应

虽然紫外线的有害效应比有益效应更为通常,但它在治疗上是有用的。

### 7.6.1 维生素 D 的产生 <sup>[1,2,4-P.247,26]</sup>

紫外线对正常人皮肤的唯一完全搞清楚的有益效应或许就是维生素 D 的产生。维生素 D 是钙从肠道输运中以及骨骼代谢中的一个因子。这些维生素通过确保适量的骨钙化以防止儿童患软骨病(骨软化)以及成年人患骨软化病(骨骼物质损失)。

维生素 D<sub>3</sub> (导钙素) 在紫外线作用下通过转化 7-脱氢胆固醇在皮肤中生成, 很大的可能是在马尔皮基氏细胞中生成 (图 7-2)。维生素 D<sub>3</sub> 的进一步羟基化变成 25-OH 导钙素, 它是一种更有效的化合物。人们认为, 皮肤的颜色 (从而减弱了紫外辐射的量) 按地理位置的调节能够防止天然发生的维生素 D 中毒<sup>[27]</sup>。于是, 北欧人的肤色淡是需要的, 因为那里天然紫外线照射量不大; 住在热带的人的肤色深, 这对防止产生过多的维生素 D 是必要的。不过, 至今尚无迁居南方的淡肤色的人发生天然维生素 D 中毒的报道。因此说, 紫外线产生维生素 D 基本上仍然是种有益的效应。

## 7.6.2 皮肤病的治疗

Niels Finsen, 一位杰出的物理学家和光生物学的先驱, 因使用紫外线治疗皮肤结核而在 1903 年获得了诺贝尔奖金。虽然由于医学的发展今天已不再需要这种治疗方式, 但在许多情况下, 光能还是有治疗价值的, 如对粉刺、湿疹、蔷薇色糠疹, 特别是白癜风、牛皮癣以及单纯性疱疹。

### 7.6.2.1 白癜风

白癜风是种皮肤病, 其特点是没有色素细胞因而也就没有色素 (图 7-14), 其病因目前还不完全清楚。光疗几乎是唯一可行的疗法, 但最好的情况下成效也是很有限的。治法是局部或全身施用呋喃香豆素化合物, 然后用该药物作用光谱 (320—380nm) 的紫外线进行照射<sup>[4-PP.355, 783]</sup>。应该注意, 刺激色素沉着和产生红斑病的作用光谱很相似, 但它们可能并不完全相同。直到前不久, 人们还认为, 明显的光有害红斑效应是引起色素再生所必需的; 但是, 现在的一些研究指出, 色素反应可以与光有害损伤分开 (正如红斑病和可见损伤所表明的那样)<sup>[28]</sup>。关于呋喃香豆素化合物和长波紫外线产生色素

沉着过度的基本机制一直不清楚。然而,在用 4, 5', 8-三甲基咪喃香豆素(TMP)和这些波长的光照射后已经观察到如下现象: ①由于不活跃细胞的增殖和活化而使有功能的皮肤黑色素细胞的数目增加(在使用 TMP 并用紫外-A 波段的射线照射后 48—72 h 内检测出了有丝分裂活性); ②黑色素细胞异常增大以及角蛋白细胞周围的树突向外扩展; ③黑色素细胞以及角蛋白细胞中的黑素体的数目增加; ④黑色素细胞中的酪氨酸酶的活性增加; ⑤黑素体向角蛋白细胞转移的速率增加; ⑥非聚集分布的角蛋白细胞中的黑素体弥散(最后这种现象仅在白种人的皮肤中有)。黑素体的这种弥散性分布可以持续九个月,这说明可能出现某些长时间的基因抑制,这可能与咪喃香豆素光加成到 DNA 上有关(参阅 4.4.1)。

#### 7.6.2.2 牛皮癣

牛皮癣是种病因不明的常见皮肤病,世界上 1—3% 的人患有这种病,美国有 2—8 百万人患这种病。它的临床表现是从局部鳞状斑到大片剥落(图 7-15)。该病最明显的特征是表皮细胞明显增生,伴以生发细胞的迅速转化。

治疗牛皮癣方法的核心是想方设法抑制表皮细胞过分增生;在这方面,光疗是久享盛名、安全而有效的方法之一<sup>[4-P.703]</sup>。深入的临床观察及其后的对照研究证明,紫外-B 区的辐射(290—320nm)对治疗这种疾病是有效的。1925 年,Goekerman 描述了从局部使用天然煤焦油到晒斑照射疗法所带来的好处。由于煤焦油光敏化作用的作用光谱在紫外-A 区,所以效应的增强其本质必然是相加的,也就是说,煤焦油与紫外-B 辐射是互相独立地起作用的。Goekerman 疗法的缺点之一是煤焦油太脏,所以一般不得不在医院环境中使用。在以往几年,已有报道,局部施用补骨脂素化合物并用紫外-A 区的光照射,可使病势减轻。最近,有人叙述了一种相当有效的

治疗方法：全身施用补骨脂素并用一种新发明的高强度光照系统产生的紫外-A 光照<sup>[29]</sup>。

虽然牛皮癣的光疗效应的机理至今仍不完全清楚，但细

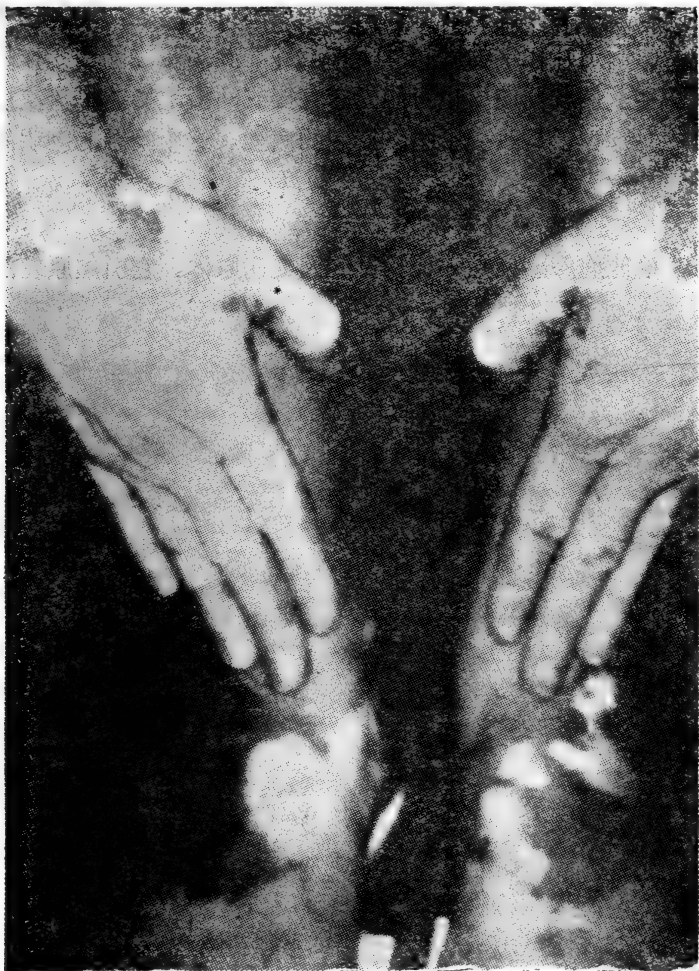


图 7-14 白癜风。白癜风的临床照片，表明因缺少色素细胞而引起的整个手脚区域没有色素。



胞增生的减弱很可能起着部分作用。320nm 以下波长的紫外线对表皮细胞 DNA 的合成和有丝分裂有明显的影响；照射后不久，它们就被抑制，而且几小时内也如此<sup>[6]</sup>。与此类似，呋喃香豆素加长波紫外线照射也明显地抑制这些功能，这可能是由于这种化学物质和 DNA 胸腺嘧啶碱基之间在光作用下发生了加成反应；也可能光疗直接或间接地影响了真皮层里的血管，于是改变了牛皮癣病的病程。这个问题的阐明尚需进一步研究。

### 7.6.2.3 单纯疱疹感染<sup>[30]</sup>

单纯疱疹感染是一种常见的人类病原体，它引起原发的



图 7-15 牛皮癣。牛皮癣的临床表现，特点是大片的红色鳞状剥落斑。



和再发的皮肤和粘膜感染,有时也可能波及其它器官。近来,有人谈到了这种病毒与人类产生癌症的可能关系。最常见的临床问题是再发性单纯疱疹感染,其特征是面部、特别是唇和生殖器局部起小泡。有两种密切相关的病毒与这种疾病有关系,发生在腰部以上的单纯疱疹感染常由 I 型病毒引起,腰部以下出现的疱疹感染一般由 II 型病毒引起。疹子可能一个月或不到一个月就出现一次,这是令人烦恼的,而且常使身体衰弱。

最近,一个研究小组倡导采用光钝化方法治疗:使用诸如二胺基吡啶和中性红等光氧化敏化染料和可见光钝化这些感染部位的病毒。这个想法来自一个这样的事实:采用这种方法能使组织培养的病毒钝化。人们认为下面设想的机制最合理地解释了单纯疱疹病毒的钝化:假定在复制期间这些杂三环染料分子嵌入病毒 DNA 的碱基之间,这个染料-DNA 复合体吸收光能,产生氧化反应,使 DNA 受破坏并丢失鸟嘌呤,这就使碱基序列中出现一些“空洞”,从而导致 DNA 链的断裂,于是病毒就不能复制了。另一种理论认为病毒寄居的细胞被破坏,从而使支持这种病毒颗粒的细胞的数目减少了。

目前,还没有确定这种单纯疱疹病毒钝化技术的临床效果和安全性。由于很难得到足够的病人作适当的对照,所以至今这些临床结果还不是令人信服的。此外,一些体外研究表明,这个方法有导致癌症的危险。因此,在进一步的资料获得之前,应该对这种方法有所保留。

### 7.6.3 全身性疾病(婴幼儿黄疸病)的治疗

历史上,光疗一直用于多种疾病的治疗。正如以前所指出的,有证据说明,紫外辐射由于在皮肤中通过光化学变化产生维生素 D 而对钙代谢疾病如佝偻病和骨软化是有益的。

说明紫外辐射有好处的另一例子就是婴幼儿黄疸病的治疗<sup>[4-P.231,31]</sup>。

胆红素( $C_{32}H_{33}O_6N_4$ )是人胆汁中的主要色素,它是当红血球的血红蛋白被破坏时(主要被肝脏的枯否氏细胞破坏)由血红素形成的;它似乎是卟啉环被打开的结果。在初生婴儿时期,大量未结合的胆红素存在于循环系统中。这是由于红血球的寿命短以及婴幼儿肝脏功能不成熟,从而使它把胆红素从脂溶性化合物转化到能随尿排出的水溶性化合物(结合作用)的能力受到限制。另外,血脑屏障的渗透性增加使新生儿的中枢神经系统更容易由于胆红素在脑细胞里的沉积(脑核性黄疸)而受损。对早产婴儿,这种危险更值得注意。目前,治疗的方案就是维持未结合的胆红素水平低于 10—15%。减少循环系统中未结合的胆红素的方法之一就是光疗,它最近受到相当多的注意。

体外研究指出,可见光将引起胆红素的光降解。实验动物(Gunn 大鼠)和婴幼儿受到强可见光照射,一方面使胆红素发生光化学变化,另一方面使循环中的未结合胆红素的浓度迅速降低。体外研究表明,可见光谱的蓝区波长(主要是 450—500nm)的光最能使胆红素发生光氧化。这些体外光氧化产物没有胆红素的毒性。不过,虽然体外产生的光衍生物与体内产生的相似,但它们并不完全一样。体内衍生物容易排泄,因此可能不会在中枢神经系统中积累而引起丘脑下部的损伤。或许,这个过程中最有趣的、至今未被解释的方面是光疗的原初效应可能与胆红素的光降解无关。受到蓝光照射的动物和婴幼儿的大部分排泄物是未结合的胆红素。因此,光疗加速了这种神经毒性物质的排泄。目前还不了解这种加速排泄的机理。

正如所有治疗一样,必须考虑到那些潜在的危害。幸好

产生的光产物似乎既无毒性又很容易排出,因此它们不会在中枢神经系统中积累。对皮肤细胞的光动力作用损伤虽然还未观察到,但必须把它看成是一种可能的有害效应。另外,关于对细菌和提纯的 DNA 的损伤效应已有报道。这样一些发现是否能与临床反应联系起来还需进一步研究。也许,光疗的最令人担心的有害效应是可能引起视网膜损伤,在受到蓝荧光照照射的猪身上已引起这种损伤。人类婴幼儿尽管也受到大量照射,但至今未见有这种损伤的记载。

## 7.7 光的间接效应<sup>[4-P.231]</sup>

光能对动物功能多方面的间接效应已有论述,如对生物节律(第8章)、性腺功能(第9章)、肾上腺皮质激素的产生等的控制。除视觉外,最有代表性的间接效应之一是射在视网膜上的光能抑制了松果体中褪黑素的形成。最近的研究认为,松果体在人类内分泌和神经系统的功能中可能起最重要的生理作用。但这种反应产生怎样的全面的影响仍需进一步研究。这些间接效应似乎是通过视网膜感受器调节的,但目前尚未证实。其它一些间接效应有心脏收缩压和舒张压的降低,活动耐受性的增加,血中胆固醇的减少和血清酪氨酸的减少。

## 7.8 结 论

光能对哺乳动物的结构和功能有深刻的影响。这些影响在人类与其环境之间的关系中起着关键的作用。主要的效应,无论是有害的还是有益的,都发生在光直接照射的部位,即皮肤上。皮肤不仅是发生光反应的最常见部位,而且也是

进行研究和检查的最方便的人类组织。因此，医学光生物学家有极好的条件进行研究，他们可以随着癌的形成来观察癌的发生发展过程，联系疾病的状态来估价辐射和化学的相互作用，他们可以研究光能对免疫过程的影响(参阅 15.5)等等。虽然研究人类的这些反应的方法学比光生物学中其它一些学科更要真实，但这些研究的意义也不要强调过头。医学光生物学的领域是宽广的，现在我们刚刚揭开了它的序幕。

(聂玉生译 沈 恂校)

## 第 8 章 生物钟学(近昼夜节律)

Beatrice M. Sweeney

(加利福尼亚大学生物科学系)

8.1	序言 .....	254
8.2	近昼夜节律的例子 .....	255
8.2.1	膝沟藻生物钟 .....	256
8.2.2	其他生物的近昼夜节律 .....	257
8.2.3	人的近昼夜节律 .....	258
8.3	环境明-暗周期对近昼夜节律的调整 .....	259
8.4	近昼夜节律的相移 .....	260
8.4.1	单次光照 .....	260
8.4.2	螺旋调相面和奇异点 .....	262
8.4.3	对节律调整的一种解释 .....	263
8.5	使近昼夜节律产生相移的作用光谱 .....	265
8.6	光和某些近昼夜节律的启动 .....	267
8.7	以强光使近昼夜节律停止 .....	268
8.8	光对近昼夜节律周期的影响 .....	269
8.8.1	周期为光强的函数 .....	269
8.8.2	自动分相 .....	269
8.9	光及近昼夜钟的膜模型 .....	270
8.10	结语 .....	271
8.11	实验 .....	273

## 8.1 序 言<sup>[1-9]</sup>

我们的地球在不停地自转着，每 24h 转一周。如果这种旋转的轴和太阳光线的平面一致，那么半个地球将永远处于黑暗中，另一半永远处于光亮下。幸好地球并非以这种方式旋转。它的旋转轴大致与太阳的光线垂直，这样就使地球的大部分表面都交替地被照亮或处于阴影之中。所有的机体都是在这种变化着的照明，即白天和黑夜交替中进化而来的。因此毫不奇怪，它们都适应于这种环境。例如，有些动物只有在白天才活动，而另外一些则是夜行性的。可能只有细菌才不在乎自然照明周期性的变化。

除少数例外，比细菌复杂的动物全能感受光。有一个心照不宣的假设，认为机体首先感受到环境光的变化，而后就作出适当的反应。只是在最近人才认识到昼行和夜行的行为并不是这样直接地受环境控制的。现在我们知道，可以用一种更精巧的方式控制在复杂的机体上所观察到的周期为 24h 的活动。已经发现有很多机体当不处在昼夜交替的环境中时仍保持它们的循环。这种现象自然地发生在昆虫和哺乳类中，例如白天居于阴暗洞穴中的蟑螂和老鼠。

**生物钟学** 对机体如何按照一天内的时间调节其功能和其它自然产生的周期性变化的研究，始于 De Mairan 1729 年的工作。De Mairan 本来是个天文学家，对植物的周期性活动发生了兴趣。多少世纪以来，人们就知道某些植物，特别是豆科植物的叶子晚上合拢，白天张开。De Mairan 想知道光对叶子早晨张开是否是必需的。他把植物置于黑暗中数日，发现它们的叶子继续合拢和张开。他认识到明-暗交替并非必要条件，一定有一种别的定时装置控制叶子的运动。

近五十多年来,生物学家可以利用越来越精确灵活的仪器。用同位素和计数器、氧电极、灵敏的记录仪、光电倍增管和其它装置,生物学家可以对其实验对象的活动作定量的测量。很多人惊奇地发现:动植物的各种生理过程的速率并非不随时间变化的。在一天内这些速率作为时间的函数而波动,有时波动相当大。特别是当机体在自然的,或在实验室内模拟的昼夜环境中时,尤其如此。这类波动并不是随机的,它们常常表现为与昼夜有关的周期性的模式。在很多情况下,例如豆类叶子的运动,这种速率的周期性变化并不需要昼夜的交替。把机体移至连续的黑暗或光照中之后,仍然可以看到这种模式的波动。在恒定照明(或无照明)及常温下,测量到的各种速率每约 24 h 达到一次最大值。因为在恒定条件下,其循环周期大约为 24h,而不是恰好为 24h,这些现象被称为“近昼夜”节律,即“大约为一天”的节律。在这一章里我们考察光对这些近昼夜节律的作用。

## 8.2 近昼夜节律的例子<sup>[1-9]</sup>

由于发现了不仅奇妙的豆科植物的叶子运动有近昼夜节律,而且那些明显重要的生理过程也有节律,这就提出了如下的可能性:即使不是大多数,也有很多生物能根据它们的需要而获得一天内的时间信息;而且,这种功能是先天的,与外界的明暗无关。那么这种“告诉时间”的能力在多大范围内存在呢?它如何工作?有什么用途?所有这些问题都变得迫切了。在这一节我们讨论某些近昼夜节律,以及每一种节律又是如何被发现的。

### 8.2.1 膝沟藻 (*Gonyaulax*) 生物钟<sup>[8.9-p.567]</sup>

多鞭膝沟藻(*Gonyaulax polyedia*)是一种海洋双鞭甲藻,常见于很多靠近海岸的浮游生物中。它们是一些能够进行光合作用的单细胞生物。它们有一种很有趣的性质:突然摇动时能发出蓝绿色的闪光。由于出现了光电倍增管及其附加线路,就有可能测量这种闪光的光量。很令人意外的是在明-暗周期的不同时间内取来的细胞发出的闪光可有 100 倍的变化。在夜晚,观察到的闪光很亮;而在白天,细胞发出的光比较弱(图 8-1)。如果把培养的膝沟藻样品移到光强不变并且仅仅够进行补偿呼吸的光合作用的环境中,这种生物发光

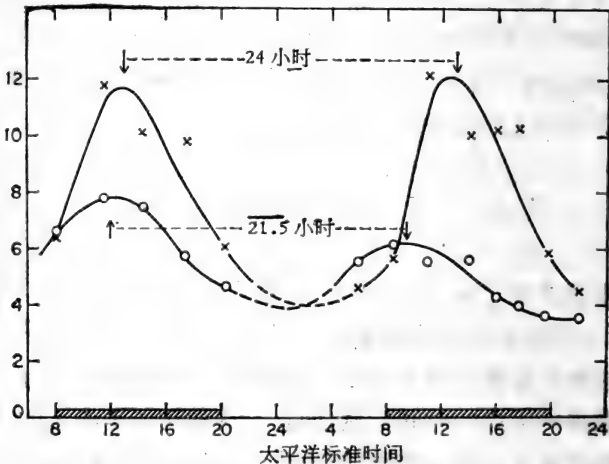


图 8-1 多鞭膝沟藻生物发光的近昼夜节律。实验样品为同一次培养的。一组留在明-暗周期(x)中:另一组(o)在测量前 60 h 移到连续照明的冷白荧光下 [580 lx (勒克斯)]。两种情况下温度皆为 22℃。环境变暗期间在横轴上表示为暗条形。箭头指示计算的生物发光最大值的时间。注意:在明-暗循环中的一组周期是 24 h;而在连续光照中的那一组周期则为 21.5h。



的亮度仍按约 24 h 的周期而变化(图 8-1)。已经发现这种生物发光节律的确切的周期与环境温度有关,但周期长短随温度变化并不甚大。有趣的是在较高的温度下,周期稍长。

生物发光的节律并非膝沟藻属唯一的生理节律。如果以  $^{14}\text{C}$ -碳酸氢盐对光合作用中的固碳作用进行测量,这个过程也随时间而变化。固碳作用最大的时间约在明-暗周期的中点;而且,把细胞移至连续的昏暗光照下之后,周期性仍很明显。光合作用的这种近昼夜节律也可以通过测量细胞产生氧的能力来衡量。膝沟藻细胞只在黑夜即将结束时分裂,这种活动也不直接依赖于明-暗周期性地变化。所有这些节律活动似乎都为一种定时机构,即一种生物钟控制。

### 8.2.2 其他生物的近昼夜节律

已经发现很多其它生物也有近昼夜节律,这里无法一一列举,少数例子就足以说明有周期性的过程的多样化了。果蝇(*Drosophila*)由蛹变为成虫的过程叫作“羽化”,它仅仅发生在接近拂晓的几小时内。白天眼虫藻(*Englena*)会游入光束内,但在夜晚却不能。一种霉菌脉孢菌(*Neurospora*)的某些菌株能形成孢子,叫作分生孢子,这种过程只能在每天的一个很短的时间内进行。这种菌在固体表面生长时,那些颜色发暗的孢子每天形成一个可见带。任何人,只要在一个内装滚轮并能发出轧轧响的笼子里养过一窝小鼠,他就会知道这些动物在夜晚活动。所有这些过程若处于恒定的环境中,在一段时间内仍继续是周期性的,且周期接近 24h。一般,适于光照环境的过程只发生在白天,而那些在光照下没有用或有害的过程则仅发生于夜晚。

### 8.2.3 人的近昼夜节律

人体也是有节律的。体温、尿的排泄和睡眠等都是人近昼夜节律的例子。虽然人作实验对象并不方便，但是已经建造了环境恒定并且没有时间暗示的特殊房间，已有志愿受试者在这种房间内生活了数周甚至数月<sup>[40]</sup>。他们的功能仍然是周期性的，而且一般周期长于 24 h。

我们人的近昼夜节律对日常生活的影响有时比我们意识到的还要大。我们的体温在下午比一天里其它任何时间都要高。与此相应的是此时作乘法和卡片分类工作更有效<sup>[41]</sup>。在上午的头几小时内我们会感到疼痛更剧烈，焦躁更厉害，气管炎症更严重，犹如刚开始作体力劳动和身体衰弱下去时的感觉。虽然很少有人不用钟表而靠这种能力计算时间，但很多人都注意到了自己常常刚好在闹钟铃响之前醒来。

对动物的研究表明，在一天当中某一定时间用药比在其他时间更有效。利用这种差别可以减少用药剂量，从而减小有害的副作用<sup>[42]</sup>。

只要旅行的速度较慢，我们就很难发现时区。而现在喷气式飞机是如此之快，致使我们可能在几小时之内体验到白天和黑夜完全颠倒。很多人到达一个新的时区时都感到筋疲力尽。众所周知的“喷气时滞”<sup>\*</sup>就是由于体内外时间矛盾的结果。我们对人的各近昼夜节律如何互相同步并如何与环境同步的问题还知之不多。光能够像影响其他生物一样地重调人的节律吗？如果我们能对这一点了解得多一些，就可能计划我们的旅行，以使得各种节律都能迅速地同步，避免喷气时滞的不适之感。

---

\* 高速飞行时引起的生理节律破坏。——译者

### 8.3 环境明-暗周期对近昼夜节律的调整<sup>[3-5,8]</sup>

如果在一非周期性的环境中测量近昼夜节律，通常会发现其周期与 24 h 稍有差别。但是在自然条件或在明-暗周期为 24 h 的实验室内，近昼夜节律的周期则恰好为 24 h。如果不这样，有节律的过程就迅速地与环境失去同步，而且不能起到有用的计时功能。因此，环境的明-暗模式一定影响近昼夜节律，或“调整”它们，从而使其与白天-黑夜的变化一致起来。虽然近昼夜节律的存在不以周期性的环境为条件，但它们对这样一种环境并非不敏感。

在对各种近昼夜节律研究的相当早期的阶段就已经清楚了：如果在夜晚给生物照明，而在白天使其处于黑暗之中，那么它的节律就会重新调整，而与新的明-暗周期一致。转变之前在夜晚达到最高值的那些过程，现在在新的黑暗的期间内（即外界的白天）达到最高值。原来发生在白天的过程，现在发生在夜晚。由此可见各种节律性过程的定时功能并非由地球旋转而决定的，不是不可改变的，而是由生物感受到的明-暗周期决定的。

把各种有节律的生物暴露于周期短于或长于 24 h 的明-暗环境中的实验表明：假如这个新周期与已习惯的 24 h 的自然周期差别不大，那么在这种条件下，这些节律重新调整，与新的环境周期一致。

机体并不能学会新的循环；这一点是很清楚的。因为把它们放回到连续的条件，它们立刻恢复通常的近 24 h 的节律，甚至当那种不正常的循环已经继续了数月之后，仍能如此。事实上已经证明在机体生活的任何时期，明-暗周期对其近昼夜节律的存在都不是必要的。膝沟藻即使在连续的亮光

下培养了多代，已经失去了节律性，但正如后面我们将要看到的，只要把它们移至连续的黑暗中(好像正常情况下夜晚开始一样)，它们马上就变为有节律的了。把在连续的光照中养的果蝇幼虫移到连续黑暗中时，它们也变为有节律的了。对棉蛾(*Pectinophora gossypiella*)正在发育的卵给以短时光照就能引起孵化过程产生近昼夜节律，以后我们还要谈到这一点。由此可见近昼夜周期不是学习的结果，而是由编在遗传密码中的信息决定的。最近的工作再次肯定了这一点。在绿藻(*Chlamydomonas*)<sup>[12]</sup>、果蝇<sup>[13]</sup>和脉孢菌<sup>[14]</sup>中诱发的变异能导致异常的节律周期

## 8.4 近昼夜节律的相移

### 8.4.1 单次光照

近昼夜节律是怎样调整从而与生物所在环境的明-暗周期匹配的呢？使处于连续黑暗中的生物接受一单个光脉冲的实验对此提供了一些信息。把人工培养的膝沟藻由明-暗循环的环境移至连续的黑暗之中，生物发光仍然继续3—5天，而后才因没有光合作用饥饿致死。如果把这种已移至连续黑暗中的培养物的一部分在其发光增加的时候施以强光照3h<sup>[9-P.567]</sup>，则以后发光的最大值将会比未光照那部分来得迟(图8-2)。但是，如果在发光最亮或发光减少的时相内给予光脉冲，随后的最大值将比连续黑暗中的对照组来得早(图8-2)。如果在发光弱的白天里给以光脉冲，则随后的生物发光最大值的出现时间不受影响，或影响很小。可以把这些发现归纳在一个图内；把以小时表示的节律提前或节律延后作为给予光脉冲的时间的函数画出。这样的曲线叫作时相反应曲线。在不同的机体中，这种在一个亮光脉冲之后发生相移的

时相反应曲线的一般形状惊人地相似(图 8-3)。所有曲线都表明节律周期中一般发生在白天的那部分受光的影响很小,而在夜晚则会有大得多的相移。正常情况下,在周期的夜间部分的中点发生由延后变为提前的突然变化,这是所有时相反应曲线的特点。相差很远的生物,例如果蝇<sup>[17]</sup>、肉质植物高凉菜 (*Kalanchoe*)<sup>[16]</sup>、膝沟藻<sup>[8]</sup> 和脉孢菌<sup>[18]</sup>, 它们的时相反应很相似,这一点很难说是巧合。

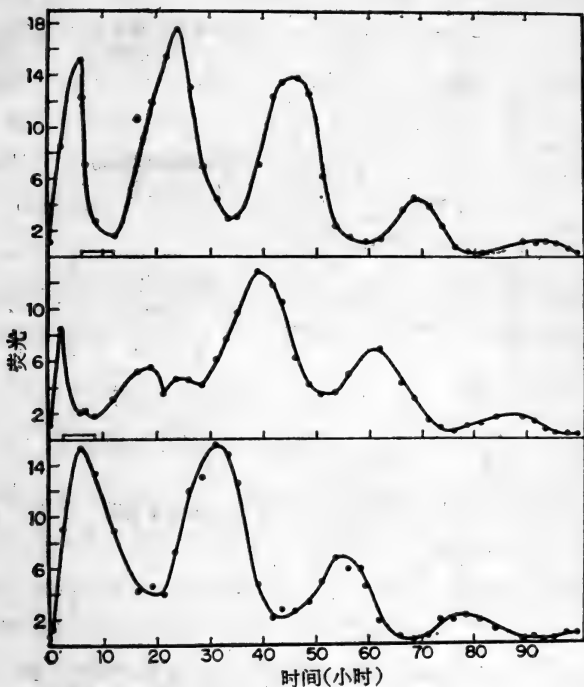


图 8-2 多鞭膝沟藻生物发光节律的相移实验。最下面的曲线表示在连续黑暗中的节律。其它两条曲线表示细胞用冷白荧光(14000 lx)光照 6 h 的结果;中间曲线:在发光增加的时候光照,时相延后;上面的曲线:当发光下降时光照,时相提前(引自参考文献 9, p.567)。

引起相移的光敏性在不同机体内有很大的变化,对膝沟藻来说比较暗的光对果蝇可能就是非常明亮的了。

#### 8.4.2 螺旋调相面和奇异点

图 8-3 中的那类时相反应曲线,每一条都代表不同时间上单次光照(通常光注量都比较高)的效应。为了表示改变光注量和光照时间对后面的节律时相的影响,需要有三维表示

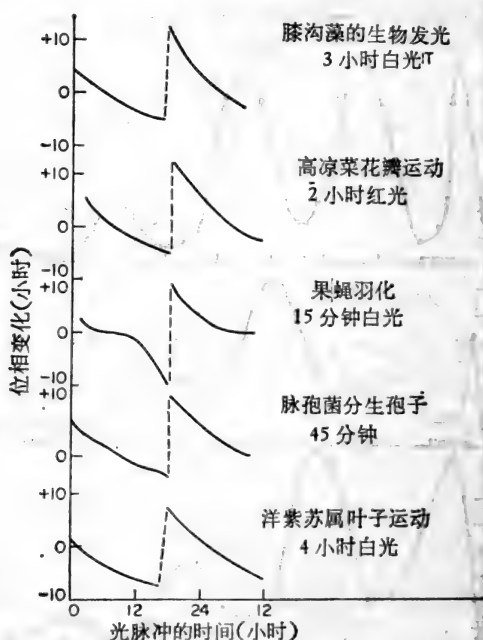


图 8-3 五种不同机体的近昼夜节律的时相反应曲线。注意: 时相提前为正, (向上); 时相延后为负。以虚线连接曲线的提前和延后的部分。取光照的中点为细胞接受光的时间(横轴)。膝沟藻的资料是根据 Hastings 和 Sweeney 的数据重画的。高凉菜的数据引自 Zimmer<sup>[6]</sup>, 果蝇的数据引自 Pittendrigh<sup>[17]</sup>, 脉孢菌的数据引自 Sargent 和 Briggs<sup>[18]</sup>, 锦紫苏 (Coleus); 引自 Halaban<sup>[19]</sup>。

法。Winfree<sup>[20,21]</sup>搜集了大量的资料说明在不同的时间上给以不同注量的光对果蝇羽化节律的影响。这在技术上之所以可能是可以自动地在黑暗情况下收集由蛹变来的成虫。Winfree利用所得的数据作了一个三维模型,表示光照射剂量、时间对节律的影响。实验中在大多数蛹变为成虫时施以光照,图中第三个轴是光照后的时间。结果表明以这种方法作出的立体图是一个螺旋面,图 8-4 即为这个螺旋面的两个侧视图。这个螺旋的轴停留在  $S = 54\text{ s}$  和  $T = 6.8\text{ h}$  的一个点上。Winfree 把这个点叫作“奇异点”。黑暗开始以后 6.8 小时这个时间和光照引起相移由延后变为提前的时间相同(见图 8-3)。螺旋调相面就绕着这一点旋转向上,每 24 h 一周。沿一个  $\theta$  值画的所有的线都交于这个轴的  $S = 50\text{ s}$  处。Winfree 推测:如果在尽可能接近 6.8 h 处,即在奇异点上对一个群体给以恰好  $S = 50\text{ s}$  的光照,群体中每只果蝇可能有任一  $\theta$  值,因此这一群体表现为无节律。他的实验证明节律性确实由于这样处理而消失。后来又找到了高凉菜花瓣运动的奇异点<sup>[22]</sup>。

### 8.4.3 对节律调整的一种解释

生物在各种明-暗周期性环境中的节律活动可以通过它们对单次光照的反应来了解。在夜晚光照有节律性活动的生物可以引起多到 12 个小时的相移。这就解释了人为地使白天同黑夜相反时节律活动的重新调整。用生物在不同时间对光的敏感性不同也可以解释近昼夜节律是如何按环境的明-暗周期(包括一个周期内明、暗长短不同的情况)调整的。用未习惯的光在黑夜即将结束时照射有节律的生物,引起其节律的提前。同样,在明-暗变化中,如果暗的时间短于 12 个小时,则引起每一周期的时相提前。这和短周期类似。在光照时间长

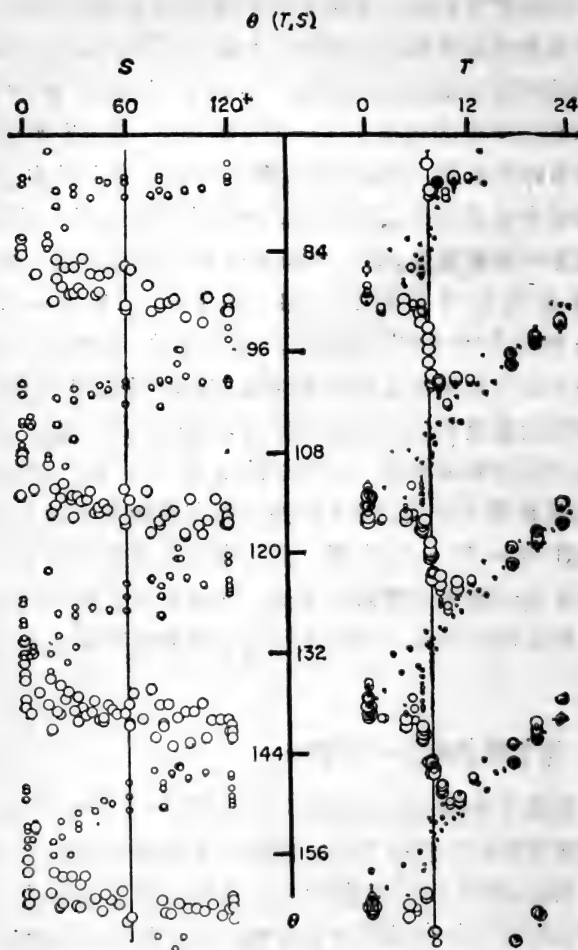


图 8-4 以果蝇群体羽化节律的数据作出的三维调相面的两个视图。符号  $S$  代表光的剂量;  $T$  代表光照时间;  $\theta$  代表光照后大多数蛹都变为成虫的时间(小时)。左侧的小圆圈表示  $T > 7.3$  h 各点的投影给出的三维的效果。为了清楚起见,  $T$  从第 15 h - 24 h 已删去。右侧投影给出在各种  $S$  数值下的数据: 点为  $S = 0-30$  s, 小圆圈为  $S = 31-60$  s, 较大圆圈为  $S = 61-90$  s, 而最大的圆圈表示更大的  $S$  值。所用的光为蓝色, 强度约为  $10 \mu\text{w}/\text{cm}^2$  (引自参考文献 20)。



于 12h 的周期性环境中，如果在节律的夜晚时相的早期照射机体，就使下一高峰延后，使表现周期加长。在昼长夜短的节奏变化的夜晚时相内，早光照和晚光照的共同作用就是先使时相延后，而后又使它提前。

如果在几小时之内相继给予两次光脉冲，第二个脉冲的效果表明基本的节律已经迅速地被第一个脉冲重新调过了。然而不会立即得到节律的最后时相，这只有经过几个过渡的周期之后才可能，特别是在多细胞生物情况下尤其如此。这就是说与新的明-暗周期的同步不会立刻实现。

## 8.5 使近昼夜节律产生相移的作用光谱

光生物学的一个普遍的原理是要想产生效应，光必须被吸收。因此有时可以通过测量一种效应的作用光谱来证实光感受器分子，方法是判断出它是哪一种已知分子的吸收光谱(参阅 1.5.4 和 3.7)。找出是哪一种光受体与节律的相移有关很有意义，特别是因为对节律系统的生物化学还了解得很少。是否所有生物都利用同样的光受体分子移相？当一个生物内有一种以上的节律过程时，它们用同一光受体吗？时相提前和时相延后是不是都与同一种光受体有关？作用光谱可以对这些问题作出回答。至今只测出了少数节律活动的较为详细的作用光谱。果蝇羽化节律的时相提前和时相延后仅由波长短于 500nm 的蓝光引起，但是在作用光谱的 350nm 和 500nm 之间却没有任何可以说明光受体本质的峰(图 8-5)。棉蛾孵卵、羽化和产卵的节律全由蓝光的明-暗周期引起，而红光(600nm)却不行。膝沟藻的生物荧光节律时相提前既可以由蓝光引起，也可以由红光引起(图 8-5)，其作用光谱在 470 nm 和 650 nm 处有很陡的峰。但是在这些光谱区叶绿素

有挡光的作用,这可能使光受体的作用光谱失真,所以它并不真正代表光受体的作用光谱。很显然叶绿素并不是这种光受体。红光能够使肉质植物落地生根(*Bryophyllum*)的叶子吸收  $\text{CO}_2$  节律的时相提前,但蓝光却不能<sup>[25]</sup>。熟知的室内植物锦紫苏(*Coleus*)<sup>[19]</sup>的叶子节律性地移上和移下。在光引起时相提

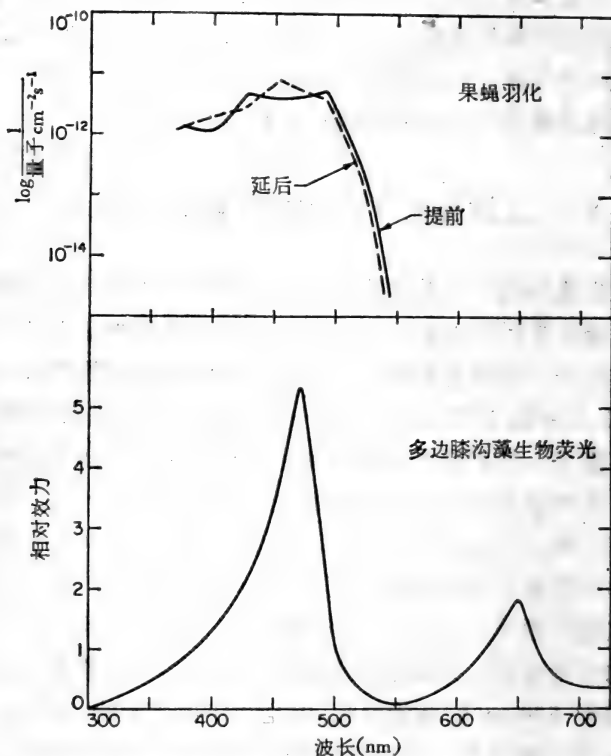


图 8-5 引起果蝇羽化节律和多鞭膝沟藻生物发光节律相移的作用光谱。虽然果蝇的时相提前和时相延后的波长特异性和阈值强度都一样,但它们与膝沟藻的相移有效波长却显著不同,说明这两种生物有不同的光受体。果蝇的作用光谱是根据 Frank 和 Zimmerman 的资料重新画的,膝沟藻的作用光谱资料来自 Hasting 和 Sweeney<sup>[17]</sup>。

前的作用中红光有效,而时相延后则只能由蓝光引起,红光不行。菜豆(*Phaseolus*)的叶子也有节律性运动,用红光照射可以作出它的时相反应曲线。以光照射产生运动的部位即叶子基部的叶座时,既能引起时相的延后,也能引起时相的提前。很显然,不同生物体内引起节律相移的光受体是不同的。蓝光能有效地使棉蛾的所有节律发生相移,说明每种生物的各种节律相移可能都是由一种光受体负责的,但这一点还需要用其它机体实验肯定。至今,还没有证实与这些节律有关的任何光受体分子。然而有有力的证据说明果蝇的光受体分子不是类胡萝卜素,因为不给它们吃胡萝卜素并不能改变光敏感性<sup>[27]</sup>。

紫外线和可见光都能使膝沟藻的生物荧光节律和细胞分裂节律产生相移<sup>[28]</sup>。在夜晚,把它们短时地(2—4 min)曝露在紫外线辐射之下(254nm, 24Jm<sup>2</sup>),可足以使那些节律产生多到9个小时的相移。而在白天这种照射只能引起很小的相移。紫外线照射后产生的相移全是时相提前,可见其时相反应曲线和可见光的十分不同。原生动物草履虫(*Paramecium*)<sup>[29]</sup>的性融合节律也能以紫外线照射调整。

## 8.6 光和某些近昼夜节律的启动

如上所述,有些生物如果饲养在黑暗中,它们是没有节律性的,但经短时光照后就开始了节律活动。棉蛾孵化节律,脉孢菌菌株“timex”的孢子分生节律都是如此。两种生物中引起节律活动的作用光谱都已测过,400—500nm的蓝光最为有效(图8-6)。这些作用光谱有某些特点:在大约420nm和460nm处有些小的峰。两种作用光谱在波长短到350nm处仍有活性。但是很难鉴定峰值在蓝区的作用光谱属于什么特殊

的色素，因为在光谱的这个区域有一些类胡萝卜素和黄素也有吸收。最近 Munoz 等<sup>[31]</sup> 在蓝光区研究了脉孢菌的完整细胞及其提取物，目的是检查照明时是否有色素发生漂白。他们观察到：b 型细胞色素的光还原是通过一种黄色光感受物进行的，这种光感受物质在 460、410 和 360nm 处有吸收并且可以为黄素腺嘌呤二核苷酸代替。由此，他们提出黄素是节律对蓝光反应的受光物。

启动棉蛾和脉孢菌节律的作用光谱和引起果蝇时相变化的作用光谱明显地相似。但这可能只是一种偶合，并不意味着节律的启动和时相的调整有着共同的机理。

## 8.7 以强光使近昼夜节律停止

已经发现亮光能使一些节律停止，这可能是所有近昼夜节律的一个共同性质。这些节律不仅在连续的强光中会停

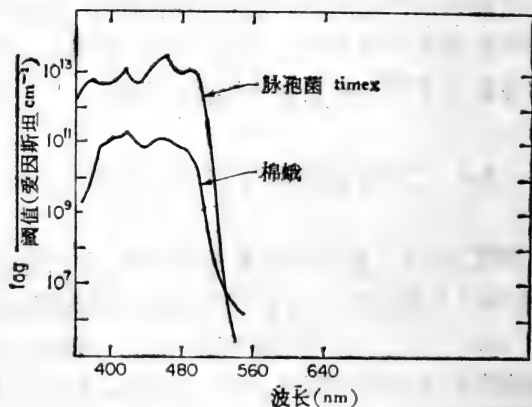


图 8-6 引起脉孢菌菌株“timex”孢子分生节律和棉蛾孵化节律活动的作用光谱。脉孢菌作用光谱是根据 Sargent 和 Briggs<sup>[11]</sup> 的资料重画的。棉蛾的是根据 Bruce 和 Minis<sup>[30]</sup> 的资料重画的。显然，这两种作用光谱很相似。

止；在 12 h 光照期将要结束的某一时刻给强光照明，节律也会停止。而当把这些细胞由上述强光下再移至黑暗中或弱光照下时，节律立刻开始出现，好像这个时间代表正常夜晚开始一样。还不了解这种效应的作用光谱，因此也就不能说明这种强连续光效应的实质，不知它是否只是已观察到的在主观夜晚开始时给以光脉冲引起时相延后的一种极端的情况。

## 8.8 光对近昼夜节律周期的影响

### 8.8.1 周期为光强的函数<sup>[32-34]</sup>

光对近昼夜节律还有另外一种作用有待讨论，这就是在连续光照下周期对强度的依赖关系。强光能完全抑制节律（“强”是一个相对的词，对不同的生物“强”的含义不同）。因此用来研究连续照明中影响周期变化的强度范围很小。尽管有这种局限，还是知道了一些生物的周期与光强有一定的关系（图 8-7）。有些生物节律的周期在强光中较短，另一些生物则恰好与此相反。

### 8.8.2 自动分相

Brown<sup>[35]</sup>曾提出一种见解，认为一般观察到的在恒定环境中近昼夜节律周期并不恰好是 24 h 这一点与不同的光反应有关。这些不同的光反应可以从时相反应曲线（图 8-3）清楚地看到。Brown 相信，近昼夜节律是对一种未知天体因素的反应，那种因素随地球以 24 h 为周期的旋转而变化。如时相反应曲线所示：虽然环境的光强不变，但在一个周期内生物体对光的敏感性却发生变化。因此表观周期代表时相反应曲线的积分。如果这个“自动稳相”假说成立，那么在恒定照明环境中某一温度下，当时相反应曲线包含的时相提前多于时

相延后时，周期就短于 24 h；如果时相提前少于时相延后，周期就长于 24 h。但是，膝沟藻在温度为 24℃ 的恒定光照下周期长于 24 h。而同样在 24℃ 温度下几种不同光强度的时相反应曲线中时相提前多于时相延后，也就是说积分为正(根据作者实验室的 R. Christianson 未发表的资料)。如果发生自动稳相，周期应短于 24 h。因此，似乎在恒定条件下观察到的周期是生物钟的自然周期，而恰好为 24 h 的周期是通过相移达到的。

## 8.9 光及近昼夜钟的膜模型

如果我们能在分子水平上解释光使近昼夜节律停止和开始，以及引起其时相变化的原因，那是很理想的。遗憾的是

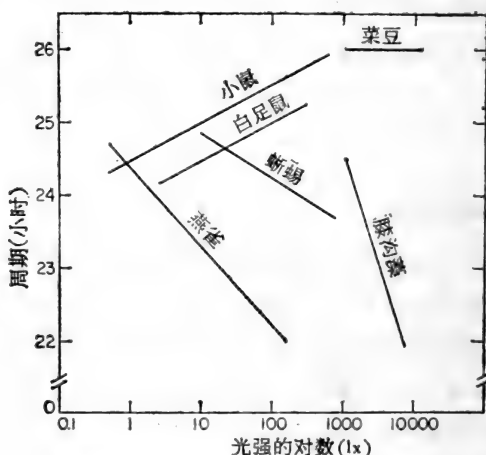


图 8-7 各种生物在不同强度的连续光照中，近昼夜节律周期的长短。此图解释了 Aschoff 的论点，即当光强增加时昼行动物如蜥蜴 (*Lacerta*) 的近昼夜节律周期缩短，而夜行动物如小鼠 (*Mus*)、白足鼠 (*Peromyscus*) 节律的周期变长。(引自参考文献 34 中的表 115, 116, 117)。

现在还不能做到这一点，因为我们无论对生物钟光受体还是对生物钟的光化学都还没有很好的了解。最近的一个膜假说的模型可能对此提供一条线索<sup>[36, 37]</sup>。按照这个模型，“钟”由反馈环组成，此环有两个部分，其一是与细胞内膜结合的离子泵，另一个是泵运输的离子的跨膜分布。泵一直工作到膜两侧的离子水平达到一临界值，此时泵关闭。膜允许一定量的离子沿浓度梯度正向扩散，所以此膜两侧的离子浓度将逐渐变得一样。此时泵又开始工作。已经证明，光照某些细胞（例如伞藻 *Acetabularia*<sup>[38]</sup>）的原生质膜，能改变它的静息电位，说明光引起了膜通透性的变化。而任何这类的变化都影响设想的生物钟反馈环的状态。如果照明出现在泵不工作的时间内，会观察到时相提前，如果发生在泵工作的时间内，会引起时相的延后。只有知道是否存在这种对离子分布敏感的泵，知道这是些什么离子，更多地知道在各种系统中光对离子通透性的影响，我们才能肯定地解释光对近昼夜节律的影响。

## 8.10 结 语

我们已经看到：可见光至少以四种明显不同的方式影响近昼夜节律。环境的明-暗循环，不管是自然的还是人工的，都能引起这些节律变化，使其周期与环境一致。这是通过一系列对光反应的单个相移达到的。在不同的时间进行单次曝光，引起近昼夜节律的相移不同。用对各种机体来说比较亮的光照射它们，得到的时相反应曲线形状一样。尽管因资料还不完全，不能下最后的结论，但很可能用弱光照明的结果也同样如此。某些生物培养在黑暗中节律停止，此时光照能引起节律重新开始。光也能引起节律的停止，起作用的时间是在白天即将结束的时候。最后，光还能影响恒定条件下近昼

夜节律的周期。很多种近昼夜节律都对蓝光有反应，但是红光也能使某些节律，特别是植物的节律产生相移。很明显，不同生物中光受体分子并不相同，但至今还没有证实任何一种分子类型。果蝇的光受体不是胡萝卜素，植物的光受体也不是叶绿素。至少有两种近昼夜节律可因紫外线照射而发生相移。

光对所有近昼夜节律都能产生强烈作用。我们有理由相信光受体受到光的照射时发生的光化学反应与生物钟化学有密切关系。但是，至今还没有把光受体作为研究细胞内近昼夜节律的探针来加以利用。为了搞清这一令人费解的现象，一个最富于成果的途径可能就是证实光感受分子以及光照引起的反应。

了解近昼夜节律有理论意义，也有实际意义。人脑力的锐敏程度和体温、睡眠、清醒程度、激素水平等等一样，在一天之内是随着时间而变化的<sup>[11]</sup>。如果能有效地使人体节律产生相移，飞行员就可以在夜晚飞行，而不必为他们不是处在解决意外事件的最好生理状态担忧。夜班工人能增加生产，而且不感到疲劳。一个工人是经常交替地作夜班和白天班好呢？还是不变动好？工作班次改变后，有什么办法可以促进体内节律的重新调整？研究不同的光照方式对人体近昼夜节律的影响，就可以找到这些及其它类似问题的答案。

越来越多的证据说明对各类药物的敏感性是接近昼夜节律而变化的。在一天当中的某一时间用药，比其它时间用小得多的剂量就能生效，这一点对包括农业害虫在内的动物和植物也适用。在最适宜的时间喷撒农药，需要的剂量最小。这样，就可以减少杀虫剂、除草剂对环境的污染。我们的近昼夜节律知识在诸如此类问题上的应用才刚刚开始，它们可能导致人类生活的某些惊人的意想不到的改善。



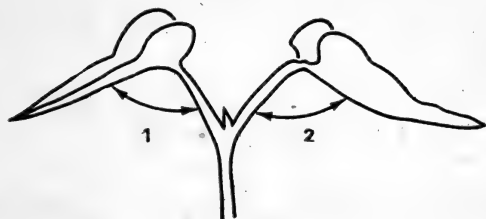
## 8.11 实 验

### 菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 叶子的“睡眠运动”

(1) 用第一、二个叶子已经展开的菜豆幼苗(2—3周)。由于测量近昼夜节律需要不止数小时的时间,因此需要把植物带回家,放在窗子上不动,或某一有利于接受尽量多光照的地方。花盆干燥时要随时浇水。如果光照只从一个方向来,每天要把花盆转一次,以防止趋光弯曲。

尽可能经常地测量两个原叶的位置,至少在起床后、中午和睡觉以前各测一次,共测两天,用一个量角器或其它装置按下图所示测量角度。

(2) 在如上述的两天后的晚上,把植物放在连续的黑暗



中或人工光照下2日,并继续测量。

(3) 在连续光照中试将你的实验植物暴露于声或其它变化的环境中。记录并将测量的结果作为时间(以小时为单位)的函数画图。对你的发现写一份简短的报告(参阅文献8, 1—12页, 19—21页, 文献9, 507—530页)。

(刁云程 译 沈 恂 校)

## 第9章 网膜外的光感受

Michael Menaker

(得克萨斯大学动物系)

9.1 序言 .....	274
9.2 无脊椎动物中的网膜外光感受 .....	277
9.3 脊椎动物中的网膜外光感受 .....	278
9.4 檐雀的网膜外光感受 .....	279
9.4.1 光对近昼夜钟的影响: 调整 .....	279
9.4.2 光对近昼夜钟的影响: Aschoff 规律 .....	282
9.4.3 光对近昼夜钟的影响: 连续强光使钟停止 ...	282
9.4.4 光对生殖系统的影响: 光周期性 .....	285
9.4.5 对光的其他可能的反应 .....	288
9.5 结论 .....	289

### 9.1 序 言

我们平时总把光对生物的作用与视觉感受环境图象联系起来。但是光还起着很多其他作用。因此把如下的情况加以区别是有益的: ① 光对生物的重要性主要在于它的能量; ② 光是作为一种信号、刺激或“触发物”而起作用的, 从生物学观点, 能量的考虑是第二位的。

当然, 第一种情况的最明显不过的例子就是光合作用(第13章), 在光合作用中生物特别“寻求”的是光能; 确实, 进行光合作用的“机器”得到了巧妙的进化, 能用最高的效率扑获和

利用光能。如果带着先验论的观点,我们可能会认为植物用来扑获太阳光能的叶绿素分子也可用于感受日出和日落。正如我们将要说明的,这种假设虽然似乎有道理,但却是不对的。

我们最熟悉的光的信号功能就是形状视觉。在这种活动中牵涉到的光能的量是比较不重要的。大多数眼睛没有进化到使它们吸收大量的光;事实上在大多数视觉情况下,眼睛的结构起着控制并往往是减少到达色素分子的能量的作用。对视觉过程来说,空间、时间模式的建立,强度的微小变化,波长的差异等要比刺激光能量的大幅度变化重要得多。对光在其中起信号、刺激或触发作用的一些其他过程来说,上述那一点则不十分明显。这些过程包括光形态建成(第 11 章),光运动(第 12 章),近昼夜节律(第 8 章)以及生殖周期(见下文)。由光色素吸收光量子的事实可以清楚地看出这些过程也涉及光感受。

光感受的特点在于它引发的生物活动需要加工处理的能量大大超过光刺激本身所包含的能量。因此,当发现一只老虎正在偷偷向你逼近时,你逃脱所需要的焦耳数将比把老虎的影像传到你的视网膜上所需的焦耳数大得无法比拟,而不管事情是在月光还是正午阳光的照明下发生。植物朝向太阳方向弯曲或者在长的白昼开花都是在处理着数量上大大超过触发这些运动的光刺激的能量,这一点虽然不太明显,但同样也是事实。而在另一方面,光合作用中被固定的碳量、紫外线杀死的细胞数,以及至少在一定程度上人皮肤被晒黑的程度都更直接地依赖于产生这些效应的光量子数。光感受是通过光感受器里光色素进行的,光感受器是比较复杂的,它们形成一个大的系统以放大对光的生物反应。

把上面两种情况区分开来以后就很明显了:一个机体可能具有很多光色素,有些在光感受器内起作用,而另一些主要

与能量传递有关。因此认为绿色植物一定利用其叶绿素分子感受日出是没有道理的，正如在 8.5 内所说的，实际也并非如此。和大多数生物一样，绿色植物的近昼夜节律是由自然光周期调整(同步)的，在这过程中所用的对光起反应的光色素，虽然还没有证实，但很明显并不是叶绿素。甚至引起光合成能力的节律变化的光色素也不是叶绿素。

生物中的一条规律就是有多种色素，并有能对光作出反应的多种光感受器。从上面的讨论来看这一点并不奇怪，但是由于我们主观光感的经验与眼有极大的关系，当知道生有成像眼睛的高度进化了的生物还有一些不甚明显的光感受器用来监视光环境中某些重要方面的时候，会感到奇怪。导致上面结论的基本观察是即使以外科手术将动物的眼睛摘除或将其视束破坏，它们仍能以各种方式对光谱的可见部分反应。为了抵销我们对图像视觉的过份强调，我们考虑这样一些环境信息，即仅有简单的光感受器而不能形成像的生物可以利用的信息。对白天和夜晚的区别使生物钟系统得到调整，而且保证了对多种生理和行为活动的适应性调节。每一年中白昼长短的有规律的变化可以明白无误地作为季节的信号，控制每年的生殖周期、迁徙、滞育和各种生物的其他重要生理反应(这种现象叫作光周期性)。照射到生物上的光强能提供关于有无阴云的暗示，即生物是处于明亮的阳光下还是阴影中，也能提供一天内时间的暗示。而且如果可以感受到月光，甚至提供月亮周期的位相信息。简单的感受器也能检测照射到它们的光的组成，并能大致检测光射来的方向。感受器的结构稍复杂一些就可大大增加上述的后一种能力。

虽然已知植物和各种简单动物利用极其简单的感光结构从其光环境中提取多种信息，最近发现有成像眼的脊椎动物和复杂的无脊椎动物也有网膜外光感受器一事甚至使大多数

光生物学家都感到惊奇。毕竟,即使生物不需要有眼来作出这种反应,一旦眼由于感受像的选择压力而在进化中形成,它似乎也应该能够很好地执行这些任务。

## 9.2 无脊椎动物中的网膜外光感受

多种无脊椎动物利用网膜外光感受这一点已经得到实验证明。几个例子就已足够说明以这种方式控制的活动的多样性。

由于大蚕蛾体大,在它们身上作手术比较简单,很久以来它们就是昆虫学家的实验对象。在了解发育过程例如滞育的诱发和结束等的激素基础方面已取得很大进展。滞育是由环境的光周期调节的(滞育是一种代谢活动大大降低的状态,昆虫借此过冬)。已知与滞育及其相关过程的控制有关的激素有几种产于和(或者)储存在脑和其他中枢神经系统的结构中。产生这些反应的光感受器也位于脑内。Williams 和 Adkisson<sup>[1]</sup> 以精巧的实验首先证明滞育的蚕蛾蛹的头端有光感受器,蚕蛾蛹就用这些感受器感受长的白天以触发成虫的发育(即滞育结束)。后来他们把长在头内正常位置的脑移植到腹部末端一个新的位置,证明光敏感性便从蚕蛾蛹的前半部迁移到后半部去了。Truman 和 Riddiford<sup>[2]</sup> 在类似的实验中证明所有蛾脑内都有光感受器以使羽化(由蛹变成虫)的近昼夜节律与明-暗周期以及对这些过程起定时作用的生物钟同步。

在控制昆虫的光周期性和近昼夜节律的网膜外光感受方面有广泛的文献报道。由于在各种各样的昆虫中都有很多这种现象的例子,因此在文献中有几个证据确凿的说明光感受仅涉及到使用复眼和单眼的例子(例如蟑螂和蟋蟀)就特别令

人感兴趣。

一些时间以前,以电生理技术研究蜥蜴腹神经索的科学家发现,光照第六腹神经节可以引起神经索纤维电活动的变化,但光照其它任何神经节都无效。进一步的工作证明第六腹神经节内有一对感受光的神经元。这些光感受器的作用光谱说明有关的色素是一种视紫红质,与蜥蜴眼中光感受色素非常相似<sup>[4]</sup>。眼不再起作用的穴居蜥蜴仍然保留这些所谓的尾端光感受器。它们的功能还不清楚。尽管有理由相信它们对运动行为可能有某些影响,但显然它们与近昼夜节律的产生无关。此外,蜥蜴还有其它确切位置不详的网膜外光感受器(可能在咽上神经节内),它们与运动近昼夜节律的调整有关。Page 和 Larimer<sup>[5]</sup>也研究了蜥蜴眼视网膜电图(ERG)幅值的近昼夜节律。他们发现,即使像这样一种网膜成分本身对光敏感的节律也可以通过可能位于脑内的网膜外光感受器而被同步。

### 9.3 脊椎动物中的网膜外光感受

证明某些鸟类和鱼有网膜外光感受已经有 50 多年了,然而只是近年来这种现象的广泛性、复杂性和重要性才变得明显起来。在脊椎动物的五个纲中,至少已知某些种动物根据网膜外感受的光来调节自己的重要生理功能及行为。对鱼类和哺乳类知道的很少(因为对前者的工作很少,而后的网膜外光感受似乎只限于新生的动物<sup>[6]</sup>)。这一点即使不考虑松果腺的光感受也是如此。关于松果腺的光感受,这里只能提一句。

所有变温脊椎动物(冷血动物)的松果体和有关的结构(如果有)例如顶眼和额器可能都能感光。在某些鱼类,两栖

类和爬行类中这一点有可靠的电生理证据。松果丛的感光结构有从简单而分散的外段样的细胞器，到高度有序的看来像简单视网膜一样的光感受器阵列，它像侧生眼的视网膜一样配有透镜并且通过神经束与脑连接起来<sup>[7]</sup>。我们还不知道鸟类松果体是否能感受光，但能相当肯定大多数成年哺乳动物的松果体没有这种功能。

我们对檐雀(燕雀属 *Passer domesticus*)网膜外光感受了解得比任何其它脊椎动物都多。为了说明这种感觉能力的复杂性，本章的其余部分全部用来详细叙述这种动物中的有关现象。为了比较，有时也引用其他种动物的资料。

## 9.4 檐雀的网膜外光感受

### 9.4.1 光对近昼夜钟的影响：调整

树栖鸟如燕雀的近昼夜运动节律很容易检验，方法是连续记录当鸟在栖木上跳跃时造成的电键闭合。以这种方法可以记录几周或几个月时间内鸟活动的时间分布(图 9.1)。当有光周期存在时，正常情况下鸟在有光时活跃，每天都在几乎同一时间开始活动(如果明-暗周期恰好是 24h)，据说它们由光周期调整(或与其同步)(见第 8 章)。把鸟放在持续黑暗中，它仍然明显地保持运动节律，但因为不再有环境的暗示，这种节律“自行存在”，其周期接近 24 h。实际上大多数檐雀类都有长于 24 h 的自行存在的周期，每天开始活动的时间逐渐变晚。被同步的和自行存在的运动节律之间的差别在木栖实验的原始数据中看得很清楚(图 9-2)。因为鸟的活动只能与它可以感受到的光同步，因此这种节律的调整是对光感受的明白无误而又容易记录的检验。

即使把檐雀的眼睛和松果腺器官摘除以后，它仍继续产

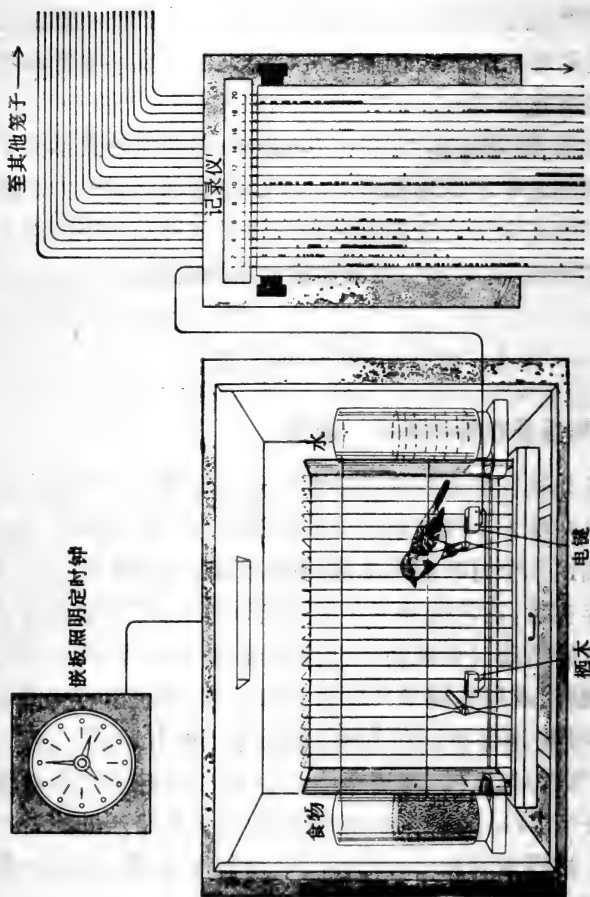


图 9-1 连续记录檐雀木栖行为的实验布置。鸟的重量把与栖木相连的电键压下，驱动一个记录笔(用一个有 20 支笔的记录器)，而记在每天移动 18 英寸(约 44cm)的纸带上。每天的记录都与其他鸟的分开。每只鸟每天的记录积累起来就得到后面一个图中表示的积累数据。虽然从活动量来看，这些数据只是半定量的，但是它们能展示出一段长时间内的活动按时间分布的精确的图画(引自参考文献 8)。



生光周期性。而且很多谨慎的有对照的实验证明它们是对可见光而不是对其他周期性的特征如热、噪声或电场等起反应。引起同步的强度阈值惊人地低：有 50 % 的檐雀对 12 h 黑暗、12 h 强度为 0.1 lx 的照明交替变化同步（这种照明相当于满月的亮度）。可以认为这个照明水平就是通过网膜外方式调整节律活动的粗略的阈值<sup>[9]</sup>。眼睛完好的檐雀能够与光照强度极低的明-暗周期同步，说明眼睛和网膜外感受器都有输出送到调整机构中去。而且，它们是近似可加的（图 9-3）。通

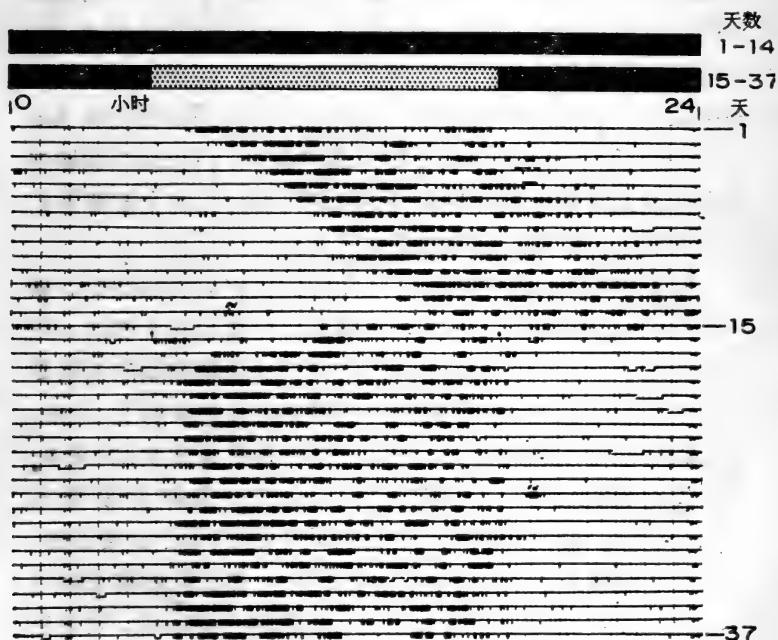


图 9-2 檐雀自行存在的和调整的近昼夜运动节律。记录的前 14 天鸟处于连续黑暗中，其节律自行存在，周期大约为 25 h。从第 15 天开始，鸟处于每天的明-暗周期中（表示在图的上部，LD 12: 12，每一周期中光照部分的强度为 0.1 lx），在这种情况下节律与光周期同步。虽然实验前已把这只鸟的双眼摘除了，但是它的记录和正常鸟的记录没有区别（引自参考文献 9）。

过拔去头顶的羽毛以增加到达脑的光强，或在头皮下注射不透明的物质(例如印第安墨汁)以减少到达脑的光强的方法已证明网膜外感受器位于脑内<sup>[10]</sup>。几位作者曾试图精确地定位。但是肯定的资料还有待于建立一种更为精巧的技术来解决。

#### 9.4.2 光对近昼夜钟的影响: Aschoff 规律

在第8章已经讨论过光对近昼夜节律的几种不同的影响。除了周期性的变化[明-暗(LD)]的光可以引起近昼夜节律调整以外，当它以连续的形式[明-明(LL)]存在时还可以影响自行存在的近昼夜节律的周期。连续光照的强度增加，它照射下的昼行生物的自行存在周期缩短，而夜行生物的周期则加长。这个经验的概括及其他与此有关的规律统称 Aschoff 规律(以 Jürgen Aschoff 博士名字命名，因为这个领域内的大部分工作都与他有关)。虽然也有例外，但这个规律得到来自各种十分不同的生物的资料支持。

檐雀遵守 Aschoff 规律，并且在它瞎了之后仍然如此。像网膜外引起调整的情况一样，有关的感受器也存于脑内。在完整的鸟中，它们和成像眼共同起作用。眼睛和脑内光感受器都完整的鸟类与摘除了眼睛的或将脑屏蔽起来的鸟比较，前者的自行存在周期随 LL 光强改变而有更大的变化(图 9-4)。因此檐雀网膜外脑的光感受器足能调整节律并表现出 Aschoff 规律。但在自然条件下它们可能和眼(虽无直接证据，有可能是网膜光感受器)共同对光反应。然而近昼夜节律对 LL 还有另外一种普遍的反应，而且对这种反应来说，至少在檐雀身上，只有脑内的光感受器是不够的。

#### 9.4.3 光对近昼夜钟的影响: 连续强光使钟停止

在很多生物中如果连续光照强度超过某一阈值，生物钟

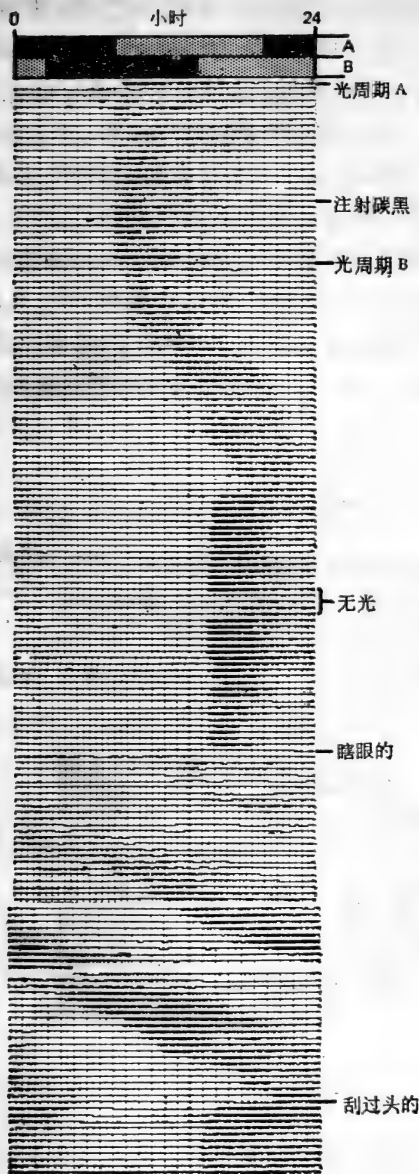


图 9-3 檐雀眼和脑的光感受器对调整昼夜运动节律的作用。本图是这种鸟活动的记录。光照情况示于图的顶端 (LD 12:12,  $\sim 0.03 \text{ lx}$ )。与光周期 A 的同步活动在头皮下注射碳黑 (C.B) 后继续存在。经 6 h 的时相延迟后, (光周期 B) 重新建立稳态需要 36 天。鸟失明之后, 自存节律为每一光周期二次。去掉碳黑, 盲鸟重新又与光周期同步 (引自参考文献 10)。

就停止。这种阈值随种属不同而有很大的变化。Binkley<sup>[12]</sup>证明檐雀也是如此。人们可能会认为这种作用只简单地是低强度 LL 对自存周期作用的延伸,但檐雀似乎并非如此,至少光感受器机制不同。虽然引起檐雀非节律性运动(是钟已经停止的指示)的恒定光强在 10—100 lx 之间,但失明的檐雀即使在强度高到 20000 lx 的恒定光照下也不丧失节律性。根据这些实验来看,脑的光感受器不足以调整檐雀的生物钟。考虑到引起同步的实验结果,即脑的光感受器对大约 0.1 lx 的光强都是敏感的,这就是说强度为 20000 lx 的光照已高于阈值  $2 \times 10^5$  倍。很明显,在光对近昼夜节律这种特殊影响方面,眼是必要的。

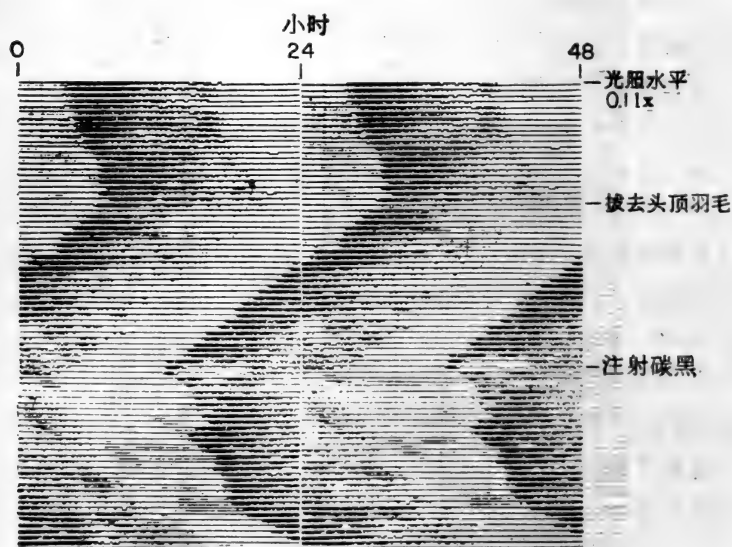


图 9-4 改变到达脑的光强对檐雀自存运动节律周期的影响。实验动物眼完好,并处在连续不变的光照(0.1 lx)中。周期起初稍长于 24 h。拔去头上的羽毛,周期变短,而随后在头皮下注射碳黑(C.B)则起相反的作用(引自参考文献 11)。

下面的事实可以进一步说明这个问题的复杂性。在完整的檐雀身上,虽然脑的光感受器本身并不足以实现对强恒定光的反应,但它们参与这种反应。如果以强度稍高于阈值( $\sim 10 \text{ lx}$ )的恒定光引起完整檐雀失去节律,那么还可以简单地通过遮蔽其脑的光感受器,而不必改变照明光强使这种节律活动恢复<sup>[13]</sup>。

在实现光对近昼夜节律的影响方面,眼和脑的光感受器之间不同形式的互相作用的生物学含义还不清楚。但是,上面简单叙述过的实验结果突出了一种动物的一个系统对环境光照反应在光感受器水平上的复杂性。尽管论及这一现象的比较复杂的方面已超出本章的范围,但值得说明的是已经在几种蜥蜴上作过关于光对近昼夜节律影响的类似分析。一般来说,蜥蜴实验的结果和鸟的相似。但是在几点细节上二者之间十分不同,特别是在眼和脑的光感受器互相作用方面,甚至一种蜥蜴与另一种蜥蜴之间也有相当的差别。

#### 9.4.4 光对生殖系统的影响:光周期性

很多动植物,特别是大多数温带鸟类,利用每年白天长短周期性变化的信息以使其生殖周期与适宜的季节一致(图9-5)。这样的反应既涉及到感受也涉及到“测量”白天的长度,总称光周期性反应。对光周期性反应可能提出的最简单的问题就是机体用什么光感受器感受光周期的? Jacques Benoit 在1935年特别针对鸭的睾丸反应提出这个问题时,他得到的回答震惊了科学界。这个回答大大出人意外,以至于直到二、三十年之后才为人们完全接受。现在来看,你就不会对此感到惊奇,回答是鸭至少部分地用它们位于脑内的网膜外光感受器来监测环境的光周期变化和调节它们自己的生殖生理。

自 Benoit 的开创性工作以来,通过脑光感受器进行的对

光周期的光感受至少已经在四种互相间没有密切关系的鸟类中得到了直接证明，这类光感受如果不是在全部有光周期性的鸟类中也是在大多数这样的鸟中存在。

对檐雀光感受的周期性，特别是眼睛所起的作用进行过广泛的研究。很容易证明檐雀利用脑的光感受器感受白昼的

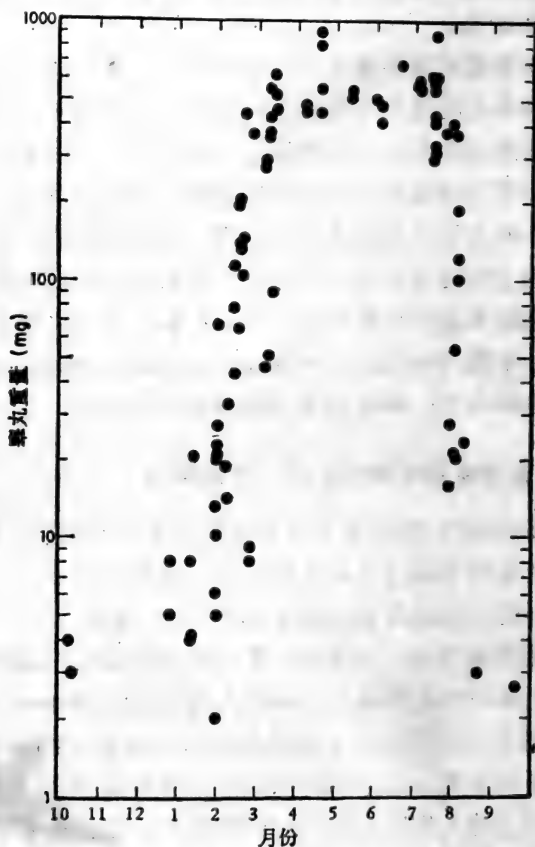


图 9-5 得克萨斯州, 奥斯汀地方一种野生燕雀(*Passer domesticus*)睾丸重量的年周期。每一点代表一个新扑获的鸟两只睾丸的重量。注意, 睾丸重量以数坐标画出(H. Underwood 的数据, 引自参考文献 8)。

长短。如果把雄檐雀在其睾丸很小而没有功能的冬天拿到实验室里,放在人造光周期(模拟春天长的白昼,例如每天有 14 小时或更长的光照)下几个星期,它们的睾丸迅速长大。不仅生殖腺重量增加多至原来的 500 倍,而且在原来只有精原细胞的睾丸管内充满精子。而在实验期间内仍养在短白昼环境中的对照鸟的睾丸则没有变化。如果用两组瞎鸟重复如上长白昼和短白昼实验,则两组完全一样。实际上瞎鸟和完好鸟的光周期性反应不论在生殖腺重量增长速度方面,还是在睾丸组织学方面都没有差别<sup>[5,6]</sup>。

这些发现导致如下的推测:在光感受中的这一特殊方面,眼可以根本就不起作用。有些发现可以增加这个设想的份量:引起檐雀光周期性睾丸增长所需要的阈强度大约为 10 lx,即约为引起网膜外同步的阈强度的 100 倍,视觉阈强度的数千倍。曾经作过一个严格的实验,将有完好眼的檐雀放在长白昼环境中,光的强度仅稍高于阈值。把一半的鸟头顶羽毛拔掉,使穿透到脑的光量增加,在另一半的头皮下注射不透明的物质以减少到达脑的光。在这种情况下拔掉羽毛鸟的睾丸长得很快,而那些注射过的鸟虽然它们的眼处在光强在阈值以上的长白昼里,其睾丸却完全没有增长<sup>[17,18]</sup>(图 9-6)。至少檐雀的光周期性的光感受明显地仅由脑的光感受器执行,这些光感受器可能与光借以影响近昼夜钟的感受器是不同的。注意:在研究檐雀对光环境四种不同反应(三种近昼夜钟反应,一种是生殖系统的反应)的过程中,发现了眼和脑互相作用的三种不同方式。两种反应只有脑光感受器就足够了,但是眼的存在也起作用(引起同步以及 Aschoff 规律),一种必须有眼的存在(在明亮连续光中的节律改变),另一种仅仅涉及到脑的光感受器(光周期性的生殖反应)。另外有理由相信,在这种动物及其它种类中还有未发现的对光反应类型。

#### 9.4.5 对光的其他可能的反应

已讨论过的檐雀网膜外光反应中，没有一种有赖于松果腺的存在，在没有它的情况下这些反应全都不受影响。尽管现在还没有直接证据说明檐雀的松果腺能够感受光，但某些间接的证据说明很可能如此。有一份文献描述过幼鸽的一种行为反应，并认为这种成年鸽所没有的反应是由皮肤光感受器引起的<sup>[19]</sup>。皮肤光感受在两栖类和爬行类是相当常见的。另外一些鸟类在幼年时期也可能有。因此我们应该在鸟类光感受器的名单上(眼及数目不详的脑内光感受器)暂时加上两

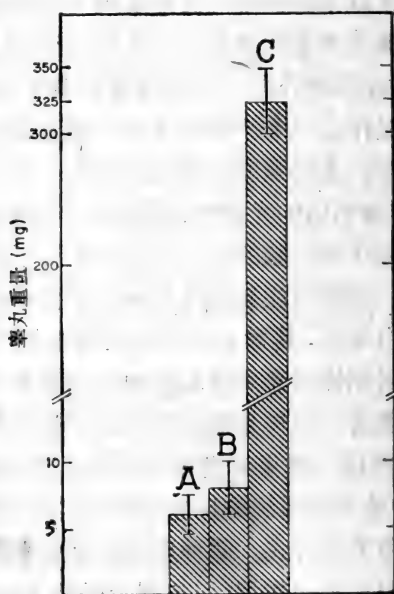


图 9-6 改变到达眼睛完好的檐雀脑的光强对辜丸重量的影响。A. 在实验开始就杀死的对照组；B. 注射了印第安墨汁的一组；C. 拔去头上羽毛的一组。详见 9.4. 4(本图引自参考文献 17, 有修改)。



种结构(松果腺和皮肤)。

在寻找鸟类控制近昼夜节律和控制生殖的光感受器的过程中,我们可能仅仅接触了现象的表面。这些反应都是最易测量的。那些不太容易检验的反应是什么呢?很可能光对生长发育影响的某些重要方面有赖于网膜外的光感受。很可能以这种方式感受的光影响脑及身体其它部分的酶的活性。对这些和大量其它问题的回答有待于进一步研究的结果。

## 9.5 结 论

应该强调的是我们对已进行的网膜外光感受的研究还不完全感到宽慰。我们或者只证明和研究了这些感受器的生理性质,但对它们的功能没有明确的认识(例如变温脊椎动物的松果体),或者认识了网膜外的光感受功能,例如对节律的调整,但是却缺乏感受器本身的确切定位和生理性质的资料。只有我们既知道几种这样的感受器系统的功能,又认识其生理特征之后,才能作进一步的分析。

- 从我们的讨论中,可以清楚地看到:很多生物具有和利用多个分离的光感受器监视光环境。令人不解的问题是以这种方式存在的光感受有什么优点?虽然我们还不能回答这个问题,但可以指出:某些了解得比较清楚的网膜外光感受系统,例如麻雀的,有力地说明它们具有某种适应的意义。

已发现在其它脊椎动物中网膜外光感受器参予的过程在哺乳类中是由眼实现的。现在知道的唯一的有完整报道的例外是光对新生大白鼠松果腺五羟色胺水平的影响,但这种现象在成年鼠并不存在<sup>[6]</sup>。

如果哺乳类中网膜外光敏感性仅限于出生后生命的早期,那么可以提出一连串与导致它丧失的发育有关的问题。

考虑到在普通医院常规中以及在对先天性黄胆实行光疗过程中,常把新生儿放在不正常的有时是极亮的光照条件下,扩大我们在这方面的知识似乎特别重要(第7章)。

(刁云程译 沈 恂校)

## 第10章 视 觉

Edward A. Dratz

(加利福尼亚大学自然科学部化学研究委员会)

10.1	序 言 .....	292
10.1.1	视觉的重要性 .....	292
10.1.2	视觉系统的种系发生 .....	293
10.1.3	脊椎动物眼睛的结构和功能机制概述 .....	294
10.2	脊椎动物视网膜的结构 .....	297
10.2.1	用光学显微镜观察到的视网膜结构 .....	297
10.2.2	用电子显微镜观察到的光感受器超微结构 .....	301
10.2.3	用化学和 X 射线衍射方法观察到的分子结构 .....	303
10.3	色素光谱和生色团 .....	309
10.3.1	生色团的结构及其光谱 .....	309
10.3.2	视色素光谱 .....	312
10.3.3	视色素光谱的波长调节问题 .....	316
10.3.4	生色团类似物 .....	318
10.3.5	光化学 .....	319
10.4	光刺激的可测反应 .....	319
10.4.1	“漂白”中间产物的光谱及其性质 .....	319
10.4.2	视觉循环 .....	322
10.4.3	心理物理学和作用光谱 .....	323
10.4.4	视网膜电图 (ERG) .....	325
10.4.5	早期感受器电位 (ERP) .....	326
10.4.6	细胞内记录的光感受器反应 .....	327
10.4.7	细胞外微电极记录 .....	328

10.4.8 通过渗透压反应测量的视杆外段离子电流 .....	329
10.4.9 人工类脂膜内的视紫红质 .....	330
10.5 视觉兴奋和适应的机制 .....	331
10.5.1 内传递介质假说 .....	331
10.5.2 传递介质的必备条件 .....	331
10.5.3 钙作用的证据 .....	332
10.5.4 与光刺激有关的酶的活动 .....	333
10.6 结 语 .....	335

## 10.1 序 言

### 10.1.1 视觉的重要性

视觉的产生无疑是一个具有魅力的问题，因为光通过视觉为人和动物提供了关于周围环境的非常详细的信息。视觉对人类尤为重要。了解眼及其机理有重要的实际意义，这样就可以避免或更有效地治疗这个重要感官的功能失调。

眼是怎样把感觉信息从光的形式转换成电信号并送到脑的呢？本章的主要目的是介绍对这个问题了解的重要进展。

脊椎动物眼含有两种类型的光感受器细胞：视杆细胞和视锥细胞。负责微光视觉的视杆细胞送到脑中的信号使我们感觉到的是只有灰度变化的无色物体。视锥细胞在亮光下起作用，并能使我们感觉到颜色。当眼经过调节很好地适应于黑暗时，我们就说它是“暗适应”的眼。在暗适应的眼中可以观察到视杆细胞的一个显著特点：如果在一簇 500 个视杆细胞中只有 5—14 个细胞吸收了光子，我们就能感觉到光。在这样低的光通量下，没有一个视杆细胞吸收一个以上的光子。暗适应的视杆细胞是一个有效的单光子检测器！这样敏感的检测是如何实现的呢？这是一个看来正在接近解决的难题。

可见光波长范围定义为人眼能够检测到的各种波长。光谱的可见范围大约从 380nm 到 700nm。下面将要详细地谈到,眼的敏感性由视觉色素的吸收光谱决定。暗适应的脊椎动物眼(暗视觉)的最大敏感度位于 500nm 附近,在这里网膜的视杆细胞吸收的光量子最多。图 1-2 给出明视觉的波长敏感度,所有动物的视觉系统的敏感度都接近这条曲线。然而昆虫却在接近紫外的区域有最大敏感度。光感受器位于脊椎动物的视网膜中,视网膜是在眼球后壁上的一层很薄的组织。由于脊椎动物的视网膜是脑的延长,因此具有重要意义。神经系统中许多信号处理的问题都可以通过视网膜来进行研究,因为视网膜比较易于接近,也易于实现对它的刺激。

### 10.1.2 视觉系统的种系发生

所有脊椎动物都有非常类似的光感受细胞。蛙、鼠、牛等相差甚远的动物的光感受器差别似乎并不大,甚至可以说是是一样的。因此研究动物光感受器所得到的结论似乎可以直接用于人的光感受器。

但另一方面,无脊椎动物在进化中形成了形态各异的视觉系统,它们与脊椎动物的视觉系统十分不同<sup>[1,2]</sup>。在最原始的光感受器中,光不通过聚焦装置而直接作用到色素细胞上。在许多无脊椎动物中已出现了原始的折光机构。头足类动物有脊椎动物样的完整的角膜-晶状体系统(图 10-1)。无脊椎动物的眼是从上皮组织(皮肤)发育来的,以单细胞或多细胞形式排列成一层,并呈杯状。对无脊椎动物视觉的研究是一个活跃的领域。某些无脊椎动物有很大的视细胞,比脊椎动物的小细胞更容易用微电极方法仔细的研究。某些无脊椎动物(例如果蝇)丰富的遗传学资料提供了极为有用的研究手段。已经发现变异能改变无脊椎动物视觉系统的发育和功能机

制。对变种的利用为视觉研究提供了很多新的途径。无脊椎动物的光感受器已不属于本章的范围，但我们将考虑那些与相应结构有关的重要资料和某些功能机制研究<sup>[1-3]</sup>。

### 10.1.3 脊椎动物眼睛的结构和功能机制概述

脊椎动物眼的光学功能可以与现代照相机相比。图10-1是一人眼横切面的示意图。光通过由角膜和可聚焦的晶状体构成的复合透镜进入眼内，通过可变的光圈即虹膜，被聚焦在薄薄的光敏层即视网膜上。灵长类的视网膜有一很小的特化了的部位即中央凹，这里的光感受器密度很大，能形成高分辨率（细颗粒度）的物像。图10-1中还画出眼睛看一棵树时简化的光路原理，与物体在照相机底片上成像类似。

然而眼的功能比照相机复杂得多，它能快速“实时”地将图像传递到脑中，并能在光强变化  $10^{10}$  的范围内调节其敏感度，以产生有用信号。眼的“机械的”虹膜孔的调节只能使光强有  $10^2$  的变化。眼完全暗适应以后，其敏感性比任何照相机底片要高出几个数量级。人还没有造出与眼性能一样的装置，但却已造出类似的装置，那就是极为灵敏的黑白电视摄像机与高保真度的彩色摄像机二者结合，能在极大的光强范围内产生有用的信号。

人们已大致地了解了光感受器的功能机制，它可以扼要地归纳如下：光被含有维生素 A 的蛋白质即位于网膜光感受器膜致密的片层结构上的视紫红质吸收。受激的视紫红质似乎引起感受器细胞内的光感受器膜释放出一种未知的化学物质。这种化学物质浓度的增大改变了光感受器细胞的电位，这种电反应又经过视网膜中一系列互相连接的细胞的加工处理，并被编为一串电脉冲码传到脑。

图10-2是一个简图，表示视网膜上接收、加工和传递信

号的各种细胞的互相联系。脊椎动物视网膜的一个奇怪的特征是它“背向”入射光排列的。在这个图中，光从下面垂直入射，到达感受器之前要穿过几层其它细胞。光感受器在视网

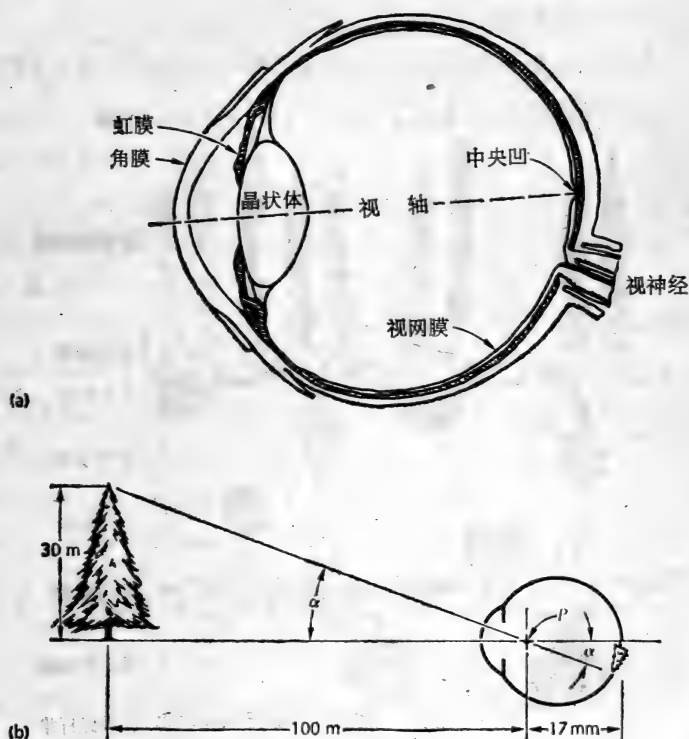


图 10-1 (a) 人眼横切面图。眼各部分已在正文中描述。眼内空间充满透明的胶冻样的物质，叫作玻璃液。视神经离开视网膜之点没有光感受器，叫作“盲点”；(b)正在看一棵树的眼的简化光路图。任何透镜系统的中心都有一点，在此点入射的光线并不折射离开原来的路径。在人眼内此点(图中点P)与视网膜的距离约 17mm。由简单的几何学就可确定出视网膜上像的大小：在本例中像的大小等于  $17\text{ mm} \times 30\text{ m} / 100\text{ m} = 5.1\text{ mm}$ ，视角  $\alpha = \arctan (30/100) \cong 16^\circ$  (引自参考文献 62)。

膜的后侧，在这个图中位于上部。视网膜的这种“向后”排列的方式看来对光感受器细胞有效地检测光没有多大影响。光首先穿过的视网膜前部几层对光的吸收很小。本图中光感受器的上方是色素上皮细胞(图中没有表示出来)，它们供应光感受器以营养物质。

色素上皮细胞也吸收许多未被光感受器捕获的光，因此

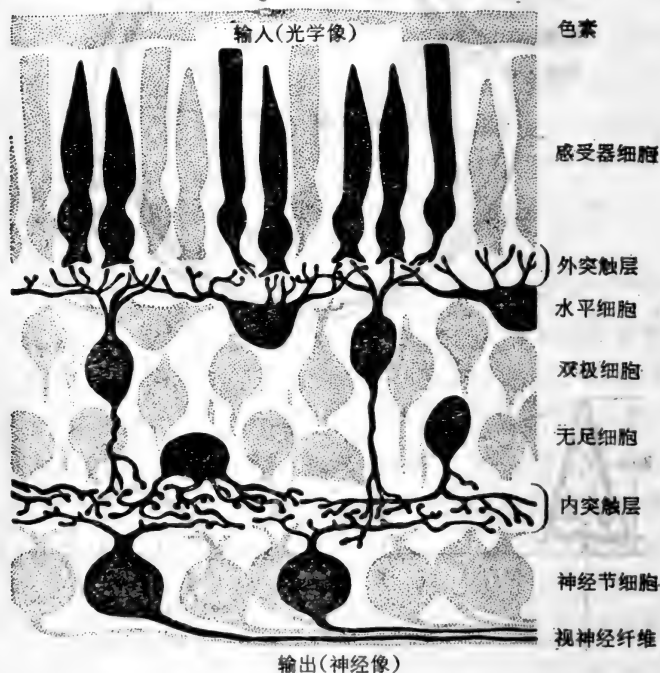


图 10-2 根据显微照片画出的脊椎动物视网膜简化图。视网膜标本以高尔基方法制备，这种方法能选择性地使少数细胞体及其突起染色。图中标出了各种细胞类型和主要的层次。如正文中所述，光从图的底端射入，并为视杆感受器和视锥感受器吸收。感受器的信号在横向上由水平细胞传递，而双极细胞则把信息传到神经节细胞层。无足细胞也具有横向传递的功能。最后的输出通过神经节细胞的轴突传到脑(引自 Werblin, F.S., *Scientific American* 228, 70-79, 1973)。



也有助于减少光在感受器之间散射造成的物像质量不佳。

感受器下面的一层含有双极细胞和水平细胞，它们中每个都与几个光感受器相连，并且它们之间也互相连接。这一层与下面各层一起，具有类似脑的信息加工功能。经过加工的信号传递到视网膜的下一部分，即无足细胞和神经节细胞层，并将脉冲信号通过视神经纤维送到脑中。经过对光的最初检测之后，接着就激发了一系列变化异乎寻常的复杂神经生物学事件。

在本章内我们将首先考虑感受器细胞的结构；其次是关于视觉色素视紫红质的最新知识；第三是各种可测量的光反应；最后是现在已知的关于这个系统的作用机制问题。我们的光感受器知识是通过量子力学、光化学和物理化学、生物化学及电生理学的实验方法得到的。最近几年对光感受器已经了解得很多，这方面的资料启示我们还有广大的领域需要去探索。

## 10.2 脊椎动物视网膜的结构

### 10.2.1 用光学显微镜观察到的视网膜结构

用光学显微镜可以研究细胞的大小、形状和它们在组织中的位置。为了对细胞做显微镜观察，先要以各种化学药物处理，以使其稳定，保持结构的完整。其次，要将组织包埋在蜡或塑料支持介质中，以切片机切成薄片。为了便于观察，需以不同的染料对组织的各部分染色。

图 10-3 是猴的视网膜组织切片。视网膜是分层的，每一层有不同的细胞类型。营养光感受器的色素上皮是从视网膜的边缘向外延伸的一个细胞薄层，从视网膜深度标尺上的 100% 处延伸到 105% 处。照片中感受器靠近上部，所占的位

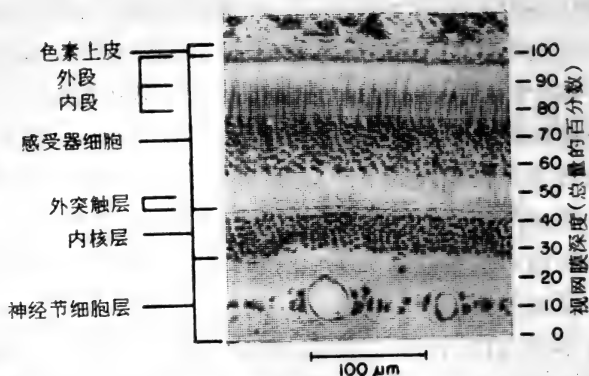


图 10-3 恒河猴视网膜周边部分薄切片的光学显微镜照片。苏木精-伊红染色使细胞核呈现为暗的颗粒。眼背部的色素上皮在图中位于顶部。正常情况下光由图的底端射入(和图 10-2 一样)各层细胞名称已在正文中讨论过[引自 K.T. Brown, K. Watanabe, and M. Murikami, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **30**, 457—482, (1965).]

置大约为视网膜厚度的 45%—100% 处, 大量细胞核的存在表明它们是视网膜中数量最多的细胞类型。在感受器以下, 深度约为 20—45% 的一层中细胞比较少。因此这一层内每一双极细胞和水平细胞接受几个感受器细胞的输入。图中视网膜深度大约为 0—20% 的最下层有无足细胞和神经节细胞, 但它们比较稀疏。视网膜各层厚度百分数自视网膜的中心向外周是变化的。感受器检测的信号在视网膜的下层进行加工, 大量光感受器的输出被译码为少数输出通道即神经元的发射速率。在实验动物上已经发现是这样进行编码的: 某些神经元专门对小的运动以及有各种取向的明-暗边缘作出反应。

光感受器细胞在形态上又分为若干部分。嵌入图 10-3 上部色素上皮突起中的所谓外段(在眼的背部)位于视网膜深度 90—100% 处; 所谓的内段位于 80—90% 处, 外核层在 60—80% 处; 纤维层在 50—60% 处; 一个突触区在 45% 附近。在

光学显微镜下，在几乎每种脊椎动物视网膜的绝大部分区域上至少可以看到两种光感受器，但在图 10-3 中却不能区分出它们。杆状细胞通常有较粗的外段和较细的内段，锥状细胞通常外段较短，而内段要粗得多。

视杆细胞和视锥细胞的分布以及它们的形态在整个视网膜上并不是一成不变的。灵长类的视网膜有一个特化的中央区称为中央凹，这里的视锥细胞很密而且没有视杆细胞。图 10-4 说明人的视网膜中视杆细胞与视锥细胞的横向分布情况。在视网膜的周边部分视杆细胞占优势，那里仅有少数视锥细胞。在中央凹排列得很密的视锥细胞有细长的外段和内段，因此它们看起来很像周边网膜的视杆细胞。这些紧密排列的视锥细胞提供了高的空间分辨率，因而保证了高的视敏

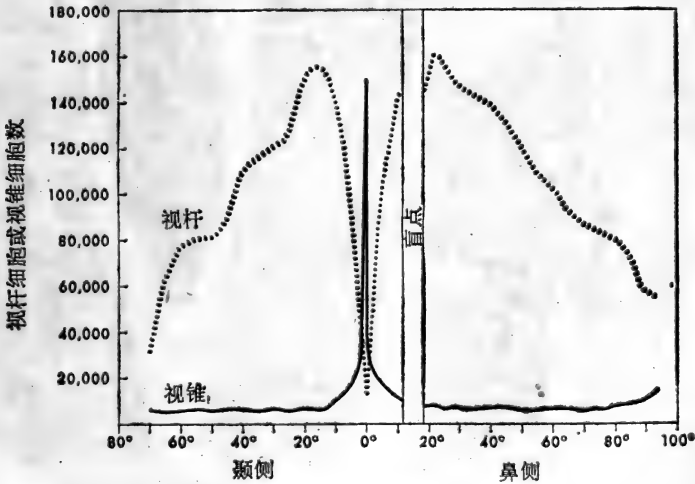


图 10-4 人视网膜上视杆细胞和视锥细胞的分布。位于  $0^{\circ}$  的中心点是中央凹，此处密密地排列着视锥细胞。在视网膜的周边只有少数视锥细胞，有大量的视杆细胞。由于盲点是视神经离开视网膜处，并且血管也通过这里，所以这里没有光感受器细胞（引自 G. Osterberg, *Acta Ophthal. Suppl.* 6, 1—102, (1935)】。



图 10-5 以戊二醛-锇酸固定的豚鼠视网膜斜切片的电镜照片，图中显示三个外段以及它们与内段连接的情况。内段含一对中心粒 (C)，其一产生一个由一连接片构成的变化了的纤毛 (CP)，在胚胎发育中外段就是从这一连接片上长出来的。外段由圆盘膜紧密堆积构成(D)，内段内挤满线粒体(M) [引自 A. W. Clark, and D. Branton, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **91**, 586—603 (1968)]。

度。许多种动物的视网膜中心附近都有特化的高分辨率区，但在灵长类视网膜上这个区域发育得最好。每个视网膜都有一个盲点，如图 10-4 所示。由于此处是视神经离开视网膜的地方，因此无光感受器。因为脑能在盲点处填上“图像”，所以我们通常并不感到盲点的存在。

感受器层没有血管。感受器必须从视网膜 100% 厚度的上方的色素上皮(图 10-3)取得营养。大多数哺乳动物视网膜的血管在远离感受器的视网膜内层穿行。在图 10-3 猴的网膜切片中可看到两根血管，它们的粗开口位于深度约为 10% 的神经节细胞层中。很多动物视网膜内没有血管，其营养是从色素上皮得到的。

### 10.2.2 用电子显微镜观察到的光感受器超微结构

电子显微镜(简称电镜)对细胞结构的放大比光学显微镜要高得多。图 10-5 示网膜光感受器层的薄切片。对光敏感的部分，即外段，是由紧密堆积的膜(在本图的下部)构成的。与外段相邻的部分即内段，具有丰富的细胞“电站”，即线粒体。在靠近图 10-5 的顶端处可以看到大量的线粒体。

图 10-6 绘出视杆外段薄切片的高倍放大，它清楚地显示出为原生质膜包围起来的片层堆积在一起。内膜成扁平的空口袋形状，称为圆盘。每个扁平的圆盘都是中空的，我们可以在圆盘的两端看到不封闭的圆圈，此处圆盘膜转了一个弯儿，我们还可以看到沿着某些圆盘的中心有一条窄的亮带。对活视网膜的光感受器进行 X 射线衍射测量清楚地证明在盘内有一个空间，但是在制备电镜观察标本时，这个空间由于脱水而部分地或全部地坍塌了。圆盘膜内表面之间的空间在等张力的条件下约为 2.5 nm。X 射线衍射测量表明它对应于渗透压的变化。圆盘与圆盘之间距离约 15nm，圆盘厚度也大约为

15nm。因此圆盘重复出现的距离为 30nm。

圆盘膜是由折叠的原生质膜形成的，在视杆中大多数圆盘口收紧形成闭合的口袋，它与原生质膜是分开的。多数视锥细胞的圆盘并不收紧，仍与原生质膜相连接，两种膜系统的

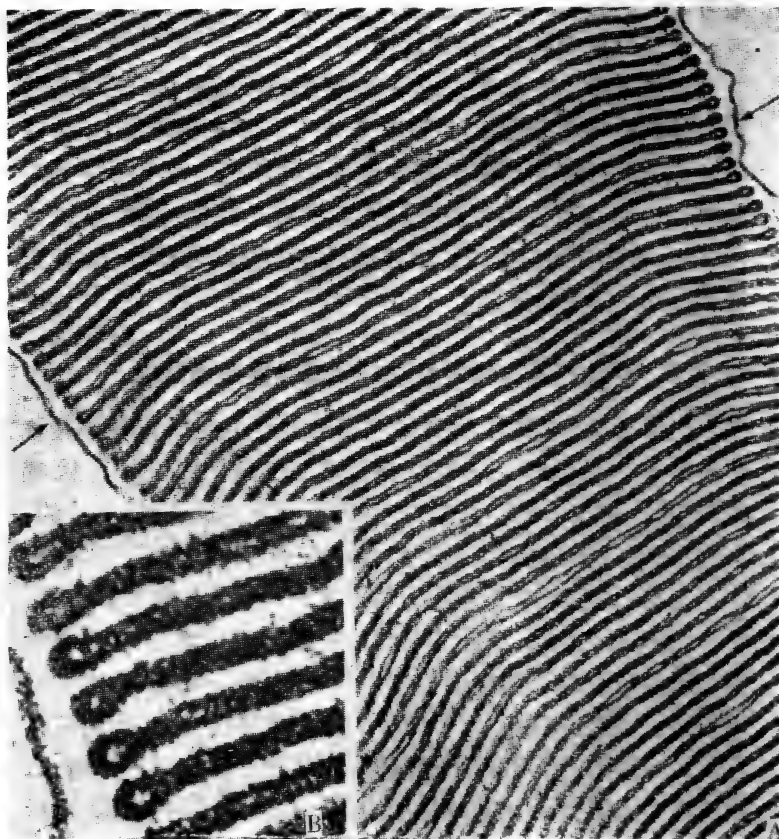


图 10-6 (A) 部分视杆外段横切片的电子显微镜照片，示圆盘膜的堆积排列。箭头指示外包的原生质膜( $\times 72,000$ );(B)经高倍放大的圆盘膜和原生质膜，注意横切片中的圆圈，圆盘膜在这里折回形成封闭的口袋( $\times 24,000$ ) [仿 M. J.Hogan, J.A. Alvarado and J.E. Weddell, *Histology of the Human Eye*, W.B. Saunders and Co., Philadelphia (1971)]。

装配机理和控制过程都尚未研究清楚。杨和他的同事<sup>[7]</sup>用放射性前体和放射性自显影的方法揭示了光感受器膜的合成及翻折的一般轮廓。对进一步仔细研究膜的装配问题,光感受器的膜系统是很有希望的材料。在与内段连接的地方,能生出新的圆盘。视杆外段的顶端一小部分一小部分地、周期性地从细胞体上脱落,被色素上皮吞噬和消化。同样,色素上皮细胞也吞噬脱落的视锥外段<sup>[8]</sup>。

视杆外段比视锥外段要大,在大多数动物的视网膜中视杆细胞的数目又非常多,因此在大多数视网膜中视杆色素比视锥色素要多得多。另外,视杆外段比视锥外段更容易被分离和提纯,因此几乎所有有关光感受器性质的工作都是在视杆上进行的。关于颜色感受器视锥的组成和结构尚待研究。

我们看到,光感受器细胞的外段是高度膜结构化的,这些膜规则地堆积在一起。这种有序排列的膜结构外表很像绿色植物叶绿体的片层。这两类膜都含有吸收光的色素。每种膜都非常薄(大约 6 nm),在外段和叶绿体片层两种情况下,光吸收的几率都由于膜堆砌程度的进化而得到提高。当然这两种膜的功能是很不同的,叶绿体将吸收的光能转换成化学能,而外段则起检测器的作用,它利用吸收的光子作为控制代谢能量的信号。近来 Stockennis 及其同事<sup>[9]</sup>揭示了一种膜系统的特征,这种膜在某些方面既与叶绿体类似又与视杆外段类似。它们不是堆积成层,而是铺在一种叫做盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)的细菌表面。吸收光的分子叫作细菌视紫红质,有点像视色素视紫红质。然而,细菌视紫红质的主要功能是进行光合作用,而不是作为一种光的受体。

### 10.2.3 用化学和 X 射线衍射方法观察到的分子结构

电子显微镜未能提供关于分子水平的结构资料。幸运地

是可以利用其它方法来获得这方面的详细资料,可以将视网膜由眼的视杯上剥离下来,而外段又可以从视网膜上断裂下来。在悬浮液中轻轻地抖动视网膜就可以获得完整视杆外段的粗制悬浮液。这种外段对许多实验都是很有用的。这样的制备液中,外段经常连着一小部分内段从视网膜上断下来。由于内段有丰富的线粒体,所以这样的制备液中混杂着大量的线粒体。至今,报道的最纯的、含外段量高的制备液都是通过强力搅拌均匀处理,将视杆外段(ROS)打成大的碎片得到的。因为视杆外段的圆盘膜有几乎独一无二的质量密度,这些碎片可以通过蔗糖或 Ficoll (一种具低渗透压的蔗糖聚合物)密度梯度离心来分开。

视杆外段呈透明的粉红色,如果对大部分可见光曝光,则漂白成淡黄色,但在红外线或微弱的红光下,可以一直保持粉红色。因此,大多数制备过程和操作都是在弱红光下进行的。视杆外段的色素部分不能被萃取到缓冲水溶液中,它们牢固地附在膜上。然而色素能溶解在一些适当的去垢剂中,而且其特征吸收光谱并不改变。颜色是由一种称为视紫红质的蛋白质造成的。如果用有效的去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)萃取色素,则视紫红质的可见光谱在黑暗中消失。在 SDS 处理过的悬浮液中,可用聚丙烯酰胺凝胶电泳法按照分子重量将视杆外段各组成成分分离开。图 10-7 表示从提纯的视杆外段中这样分离出来的蛋白质的光密度扫描。ROS 蛋白质至少有 90% 位于明胶的一条致密带内。已证明此处的蛋白质即为视紫红质。还未确定那些比较小的峰都代表什么。正如我们将要在 10.5.4 节讨论的那样,在视杆外段有几种酶的活性。某些小的峰可能对应于视杆外段的一些酶。在凝胶上运动的牛视紫红质的分子量接近 35000,此值与用其它方法得到的值相当。许多分子量大于视紫红质的微量蛋白质成分位于图 7



中明胶的左侧。其中有些可能是杂质。它们的定位和功能也还不清楚。

按干重计算膜有 43% 的蛋白质, 53% 的类脂, 4% 的糖类。膜的类脂可以用有机溶剂萃取, 并通过色谱层析方法分离。这种处理过程还能放出生色团, 即维生素 A 的一种衍生物, 关于这一点我们将在 10.3.1 讨论。大多数类脂都是磷脂酰胆碱, 磷脂酰乙醇胺, 磷脂酰丝氨酸, 磷脂酰肌醇等, 它们的比例是 40:45:15:2。这些类脂都有不同的高度极化的、与甘油分子发生酯化的磷酸二酯“头基”, 而甘油分子又与两个长链脂肪酸发生酯化。胆固醇量很少。找到了微量的鞘磷脂。可能还有少量的糖脂, 但对它们的特性还一无所知。

膜磷脂中的脂肪酸都是明显的多聚不饱和酸。在牛的视杆外段中至少有 35% 的脂肪酸是 22 碳 6 烯酸(22 个碳, 6 个双键, 称为 22:6 脂肪酸)。大多数其它脂肪酸是饱和的软脂酸(16:0)和硬脂酸(18:0)。典型的磷脂有一个与甘油的一个羟基酯化的饱和脂肪酸和一个与另外的羟基酯化的<sup>[10]</sup> 22:6 脂肪酸。

从鼠的食物中去掉多聚不饱和脂肪酸, 其视杆外段仍然具有多聚不饱和脂肪酸<sup>[11]</sup>, 而大多数其它细胞和器官在这种情况下都不具有这种脂肪酸。视杆外段含有大量 22:6 脂肪酸, 而且它们能持久地保持这种脂肪酸, 这种特性说明这些脂肪酸对于这个系统的功能是重要的<sup>[12]</sup>。

已有几个小组对完整视网膜视杆外段作的 X 射线衍射分析达到了 2.5nm 的分辨率。这些研究证明圆盘膜中许多类脂成双层排列。双层膜由两层类脂组成, 类脂的排列是使它们的极性“头”与水接触, 脂肪酸的碳氢化合物构成亲脂的内面。关于蛋白质在膜内的位置, 用 X 射线衍射方法得到了互相矛盾的结论。这种矛盾看来主要是由于在分析中忽视了膜的空

间排列的不规则性造成的。近来针对这种不规则性发展了新的方法，得到了正确的圆盘膜的电子密度剖面图<sup>[13]</sup>。后来对如此得到的 2.5nm 分辨率的剖面图的分析表明：有相当多的视紫红质从圆盘膜的外表面突起，视紫红质的分子似乎是跨圆盘膜排列的。

也用其他方法研究过视紫红质在圆盘膜上的位置。膜在结构上有一个脆弱区，在这里碳氢链在双层膜两半之间中点相遇。冰冻断裂的电镜技术揭示了这个脆弱区断面的质地特

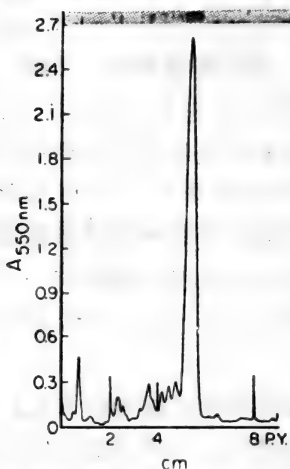


图 10-7 提纯过的溶于十二烷基硫酸钠 (SDS) 中的视杆外段膜的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。为了显示蛋白质组分,电泳后以考马斯蓝 (Coomassie blue) 对凝胶染色。染色凝胶的照片示于上部,下部为用光密度计对凝胶测得的扫描图(在染上色的位置吸收最大)。主峰为视蛋白,即视紫红质的蛋白质部分。在 2, 4, 8cm 处的尖峰是为进行长度校正用的针刺标记。9cm 处的小峰为派若宁 Y 示踪染料(P.Y),它指出这种移动迅速的标记物走过的距离。其它的小峰都是各种蛋白质组分,没有一个峰超过视蛋白峰的 1 摩尔%。SDS 聚丙烯酰胺凝胶按分子量把有最大运动性的最小组分分开。牛视蛋白移动的表现分子量为 35000,几乎所有其他微量组分都有较大的表现分子量[引自 D.S. Papermaster and W.J. Dreyer, *Biochemistry* **13**, 2438—2444 (1974)]。

征。伸到碳氢化物区域的蛋白质在断裂的表面上呈肿块状。样品断裂时，视紫红质仍然连在圆盘膜外层上。这些实验说明视紫红质与圆盘膜的连接是不对称的。在分离的圆盘膜，用不能透过膜的化学试剂进行标记，证明视紫红质的11个氨基中有一半以上易受圆盘膜外有水空间的影响<sup>[14]</sup>。这些氨基除一个与生色团结合较紧(参阅 10.3)以外，其余的都易受能透过膜的类似试剂的影响。几个实验室都证明，用一些不能穿过膜的蛋白酶处理膜能使视紫红质的肽链断开。视紫红质有两个短的由己糖和 N-乙酰氨基葡萄糖组成的寡聚糖链，它们伸到有水区与具有寡聚糖特异性的伴刀豆球蛋白 (concanavalin) A 和麦芽凝集素结合。

上述资料说明视紫红质在膜上不对称排列，其一部分表面和很大部分质量都暴露在圆盘膜外的水空间。图 10-8 表示至今提出的视紫红质在圆盘膜中位置的各种拓扑模型。

模型 II 和模型 III 已被排除。把视紫红质表示为跨膜排

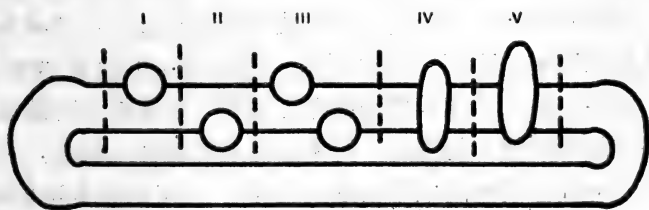


图 10-8 视紫红质在视杆外段圆盘膜上拓扑排列模型。模型 I 示视紫红质仅暴露在圆盘的外表面；模型 II 则正相反，视紫红质仅露于圆盘的内空间，不从膜的外表面突起；模型 III 示视紫红质分子既从圆盘膜的内表面突起，又从膜的外表面突起，形成对称分布。但单个分子并不横跨膜；在模型 IV 和 V 中，视紫红质横跨类脂层。IV 和 V 之间的差别在于穿透到圆盘内空间的相对深度。视紫红质的实际形状并非如图所示，这个示意图仅仅从拓扑关系上表示视紫红质在圆盘的内、外空间的暴露情况。这些模型代表“时间平均”的形象，视紫红质在圆盘膜中的深度可以改变。

列的模型 IV 和 V 得到化学标记法、冰冻断裂资料和 X 射线衍射分析的证明。用抗视紫红质的抗体标记实验也被解释为可以证明视紫红质是跨膜的。化学标记实验<sup>[14, 15]</sup>暗示类脂很不对称地跨膜排列,大多数磷脂酰乙醇胺和多数磷脂酰丝氨酸向着外侧,大多数磷脂酰胆碱可能在内表面。

视杆光感受器的膜有高度特异的功能:以信号表示对光的吸收。生物的进化找到了用组成相当简单的膜来作这种特殊工作的方式。膜主要含有一种蛋白质,即活跃的光吸收体——视紫红质,另外还有一个相当简单的类脂成分。因此这些膜已经吸引了许多对膜的一般结构功能感兴趣的工作者。

如果在浓度接近等渗的盐溶液中用斩断和密度梯度的方法将圆盘膜分离出来,它们往往互相粘连成堆。把这些胶连的膜用稀盐溶液(等渗液冲稀 100 倍)<sup>[14]</sup>处理,可将它们部分地分开。现在正对造成粘连的分子的特性进行研究,它们似乎包括蛋白质和多糖。

圆盘之间的粘连分子可以用低浓度的盐溶液部分地洗掉。如果将洗过的膜用离心的方法重新堆积起来,并将水的含量减到原来的比例(约 50%),则膜互相间就更为接近了,比在完整的视杆外段堆积得更整齐。这样得到的圆盘膜制备液的 X 射线衍射图的分辨率比完整的视杆外段高,可以得到 0.8nm 分辨率的电子密度剖面图<sup>[16]</sup>。在分辨率为 0.8nm 时,证明圆盘膜并不就是一个简单的双层类脂膜,它要更复杂。其内表面有一个大而清晰的电子密度峰,可能是由极性的磷脂头基造成的,而外层则有更多的细微结构。把圆盘膜曝露在可见光下,其电子密度图有很大变化。关于电子密度图的更深入的解释正在进行之中,这种探讨将得到一些更为详细的圆盘膜资料。

视紫红质分子在圆盘膜平面上的二维排列似乎处于动态

之中。对视紫红质生色团作分光镜测量提供了一些膜上视紫红质旋转及转换的资料(10.3)。

## 10.3 色素光谱和生色团

### 10.3.1 生色团的结构及其光谱

Wald 在许多年以前就证明了视紫红质的生色团为 11-顺多烯维生素 A 醛的异构体,一般称这个分子为 11-顺视黄醛。图 10-9 示这种分子的结构(I)及某些有关分子的结构。在视紫红质的生色团被分离以前将视紫红质曝光,则发现视黄醛为全反型的异构体(结构 III)。Wald 实验室的 Bownds 发现曝光后视黄醛通过硼氢化钠还原,能固定在视紫红质中赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基上,所以很可能在还原前是通过希夫碱基 (Schiff base) 键(结构 V, 希夫碱基键相当于结构 II 连接一个  $R-NH_2$ ) 与蛋白质连接。全一反视黄醛的还原希夫碱基键在图 10-9 中由 VII 表示。在黑暗情况下,硼氢化物不能到达生色团键,视紫红质曝光后,硼氢化物与这个键迅速反应。

可以制备出来几种不同的视黄醛几何异构体,包括 7-顺、9-顺、11-顺、13-顺、9,11-双顺、9,13-双顺、11,13-双顺、9,11,13-三顺等等。天然的 11-顺异构体在能力学上是最难生成的单顺异构体,因为在 13-甲基和 10-H 之间(见图 10-9, 结构 I)有很大的空间阻力。如果视黄醛通过碘催化作用,经加热处理异构化形成平衡的混合物,那么 11-顺异构体要比其它的单顺异构体难形成得多,因此在数量上某些双顺型异构体比 11-顺异构体多。

理论计算指出 11-顺视黄醛的立体应变由于第 12—13 单键附近的扭曲而减小<sup>[17]</sup>。预计接近于 12-S-顺构象的 (S-顺指一单键左右为顺式构象)(图 10-9 结构 II)扭曲的非平面

构象的能量最低,而 12-S-反(图 10-9 结构 I)的非平面构象的能量稍高。还可以预测,这两种形式的构象都在 6—7 键附近扭曲得很厉害,并最接近于 6-S 顺式构象。此后不久,就推出了 11-顺视黄醛的晶体结构,而这些理论预测被在晶态情况下定量地证实了。一个非平面 12-S-顺构象扭曲到平面外  $40^\circ$ ,而 6—7 键从 S-反式方位扭曲了  $135^\circ$ ,与 6-S-顺构象近似。正如核磁共振(NMR)测量所证明的那样,这些键的非平面构象在溶液中也继续存在。

在某些视觉色素中找到了另一个密切相关的多烯生色

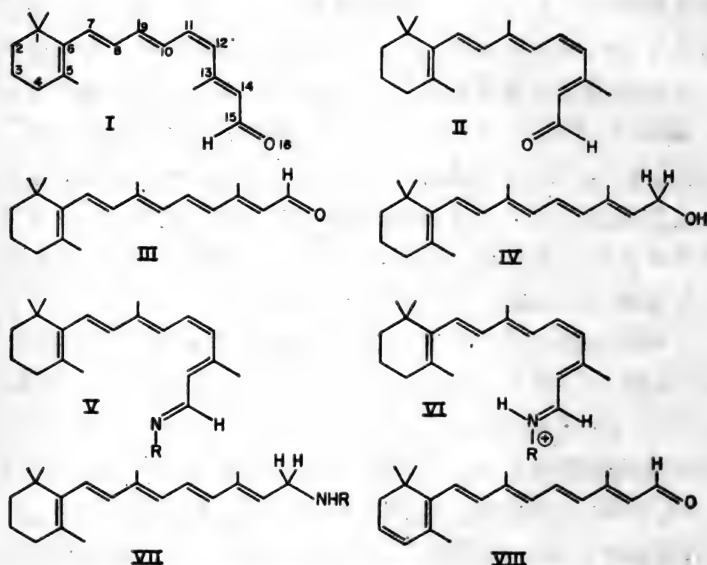


图 10-9 视觉中起重要作用的各种维生素 A 衍生物的结构。  
I 为 11-顺视黄醛, II 为 11-顺-12-S-顺视黄醛, III 为全反视黄醛, IV 为全反视黄醇, V 为 11-顺-12-S-顺视黄醛希夫碱基或 11-顺-N-亚视黄基-烷基胺, VI 为质子化的 11-顺-12-S-顺视黄醛希夫碱基或质子化的 11-顺-12-S-顺亚视黄基-烷基胺, VII 为还原的全反视黄醛希夫碱基或全反-N-视黄基-烷基胺, VIII 为全反 3-脱氢视黄醛或维生素 A<sub>1</sub> 醛。

团,称为 3-脱氢视黄醛或维生素 A<sub>2</sub> 醛(图10-9结构 VIII),在己环中有一个附加的双键。维生素 A<sub>2</sub> 醛简记作 A<sub>2</sub>; 同样,维生素 A 醛则记作 A<sub>1</sub>。现已对上百种动物的视觉色素进行过分析,它们全都有 A<sub>1</sub> 或 A<sub>2</sub> 生色团。某些视网膜即含有带 A<sub>1</sub> 的视色素又含有带 A<sub>2</sub> 的视色素,其相对的比例可能与年龄、季节或栖息地有关<sup>[18]</sup>。

A<sub>1</sub> 醛生色团的希夫碱基衍生物很容易用溶于有机溶剂的脂肪胺制备,它们在接近紫外区有最大吸收。图 10-10 中的实线和长划线分别表示 11-顺和全反-构象的 A<sub>1</sub> 希夫碱基的光谱。A<sub>2</sub> 生色团的类似化合物的最大吸收波长较 A<sub>1</sub> 生色团的类似化合物的最大吸收波长要长。11-顺生色团在最强吸收带的短波侧有两个峰值,称为顺峰,而且在每种顺-多烯中都有。全反生色团较顺式的有强得多的主吸收带和较弱的短波吸收带。如果视黄醛的希夫碱基因加酸而质子化,那么光谱的峰将移到长波段。图 10-10 中点线表示 11-顺 A<sub>1</sub> 希夫

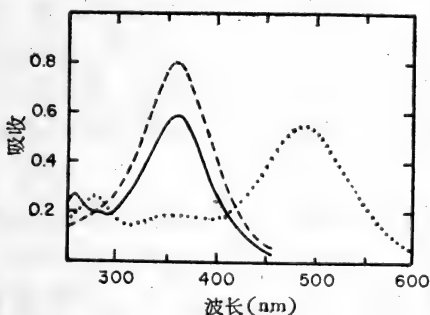


图 10-10 带 1-氨基-2-丙醇的视黄醛希夫碱基的吸收光谱。虚线表示全反-N-亚视黄基-1-氨基-2-丙醇。实线代表 11-顺-N-亚视黄基-1-氨基-2-丙醇。点线代表在11-顺-N-亚视黄基-1-氨基-2-丙醇中加入等摩尔 HClO<sub>4</sub> 制备的质子化的希夫碱基。全部光谱都是在1,2-二氯乙烷中测出的[根据 J. O. Frickson and P.E. Blatz *Vision Res*, 8, 1367—1375 (1968), 资料复制]。

碱基质子化后的光谱,其结构示于图 10-9 (VI)中。在溶液中多数视色素生色团的吸收比质子化的希夫碱基的吸收离红光更远。蛋白质环境引起的吸收峰的位移将在 10.3.3 里讨论。

### 10.3.2 视色素光谱

视色素(VP)的吸收光谱可以用三种方法测量。第一种,视色素可以从分离的视网膜中用适度的去垢剂溶液萃取。第二种,可以在原位用显微分光光度计对单个光感受器外段直接测量。第三种是可以在完整的动物身上(包括人)用 Rushton 和他的同事<sup>[9]</sup>所发展的技术进行估计:对亮光曝光前后分别测量从眼后壁上反射回来的光量,所用的亮光使大部分色素漂白。所有的 VPs 都有形状类似的吸收光谱,其消光系数很大,接近  $40000 \text{ lMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。所有天然的视色素被漂白的量子效率都很高(接近 0.67)。

不同动物的不同类型的光感受器视色素吸收光谱的惊人特点是它们的最大吸收波长的范围相当大。最大范围为从蓝光区域的 435nm 到红光区域的 625nm。现在对这种使人印象深刻的波长调节的机理还不很理解,但是它一定涉及到蛋白质和生色团的相互作用。这个波长调节的问题将在下一章加以讨论。

在大多数完整的动物眼中或网膜萃取物中都有不同的视色素共同存在。如果不同色素的最大吸收光谱互相靠得不近;那么就可以推论出上述结论,而且可以用“部分漂白”的技术计算其最大吸收。方法是测量在不同光照条件下曝光的视色素样品之间的吸收差别(差异光谱)。“漂白”是一个广泛地被用来描述视色素曝光以后发生的颜色变化的术语。在典型的实验中,相继地对远红光曝光,VPs 混合物中吸收远红光的色素首先被漂白,每次漂白后记下差异光谱,直到不能观察到



进一步的变化为止。然后减少漂白光的波长再重复上述过程。如果在实验过程中随时改变漂白光的波长以保证在每一阶段上都有 1/4 VP 被漂白, 则各个差异光谱的峰都接近 VP 的最大吸收峰。

图 10-11 表示提纯的牛视杆色素和分离的 11-顺视黄醛的光谱。位于 498nm 处的高峰称为  $\alpha$  峰, 在 340nm 附近的小峰叫  $\beta$  峰, 278nm 处的很强的峰叫  $\delta$  峰。 $\delta$  峰主要是由蛋白质中的芳香氨基酸、酪氨酸和色氨酸造成, 当然生色团在这些波长上也可能有一些贡献。在  $\delta$  波段吸收的光以很高的量子效率使视紫红质漂白。虽然某些昆虫能看见紫外线, 但人类却不能, 因为紫外线在光通过角膜和晶状体时被吸收了 (见图 10-1)。

近年来应用显微分光光度计对分离的单个光感受器进行测量, 对 VP 光谱的研究特别有用。不同的单个视锥光感受器

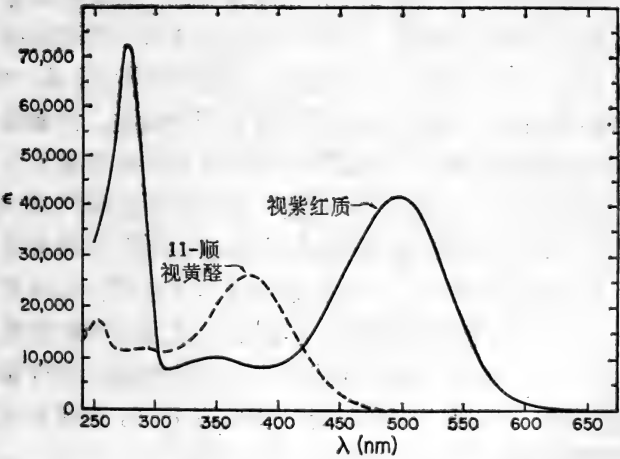


图 10-11 溶于去垢剂 Ammonyx LO 中的提纯的片视紫红质的吸收光谱(实线)和 11-顺视黄醛的吸收光谱(虚线)(引自参考文献 53)。

有不同的光谱，多种动物都有具有红、绿、蓝吸收峰的视锥细胞<sup>[20]</sup>。这些观察支持色觉的三色说：有三种类型的视锥细胞，各具有某一种不同颜色的 VP。某些动物似乎只有一种或两种视锥细胞，在这类动物中有些(鸟类及两栖类)具有彩色的油滴，只有通过这种油滴光才能到达视杆外段。同一种动物的不同视锥细胞可能有不同颜色的油滴，它们显然是起滤色片作用的。因此视锥细胞有两种类型的光谱敏感性控制方法：VP 吸收光谱的波长调节及某些情况下的油滴彩色滤光。

灵长类视网膜的中央区域称为黄斑。这个区域包括多视锥细胞的中央凹和多视杆细胞的外周区。黄斑含有一种叫做黄体素的黄色色素，它在组织中的位置还不清楚。黄斑色素在蓝、绿区有一系列相当尖锐的吸收峰，因此人眼的光谱敏感性在这个区域有所下降，这是由于这种色素的吸收屏蔽了光感受器而造成的。现在还不了解黄斑色素的功能。

利用偏振光做显微分光光度测量表明，视紫红质生色团在圆盘膜内整齐地朝向一侧<sup>[20]</sup>。图 10-12 表示看到的视杆的几何关系：从一端看，如同光照在完整的眼睛上；从一侧看，犹如实验中在分离出的光感受器上所能做的。用偏振光从侧面去看光感受器，可以发现：如果极化的电矢量平行于膜的平面，视紫红质对光的吸收要比电矢量垂直膜时强得多。如图 10-12 所示，在光学显微镜下从侧面观察，如果偏振光平行于视杆的长轴振动，此视杆细胞就是无色的。如果光平行于圆盘膜振动，视杆细胞明显地呈红色。之所以为红色是因为视色素吸收了绿光和蓝光而让红光通过的缘故。平行偏振光与垂直偏振光的吸收比(圆二色性比)为 4—6，这样大的圆二色性说明生色团强烈地沿膜的平面取向。

光进入完整的眼时总是射到光感受器的顶端，并沿其长轴行进。视紫红质的排列最有利于吸收这种光，因为从顶端

进来的人射光电矢量位于圆盘膜的平面内，没有任何组分与它垂直。正如图 10-12 所示，从顶端看时不管光是如何偏振的视杆都呈红色（即无圆二色性）。即从顶端看时，视紫红质的生色团的排列没有方向性。因此与昆虫眼不同，脊椎动物眼对光的偏振面不敏感。

如果在视杆顶端射入一束短暂明亮的偏振光，就引起很大的圆二色性，但它随即又很快地消失<sup>[21]</sup>。开始的圆二色性是由于那些排列取向恰好最有利于吸收此偏振闪光的视紫红质的光选择性及有效漂白引起的。后来，视紫红质的分子在膜平面内迅速旋转，因此圆二色性迅速消失。旋转引起的半失序时间在温度为 5℃ 时约为 20  $\mu\text{s}$ 。温度每增加 10℃，此半失序时间（即  $Q_{10}$  值）下降 2.5 倍。用分光光度计方法也测出了视紫红质在膜平面内向内侧的移动<sup>[22,23]</sup>。在 25℃， $Q_{10} = 2$  时向外扩散的常数为  $4 \times 10^{-9} (\text{cm}^2/\text{s})$ 。很显然，圆盘膜的类

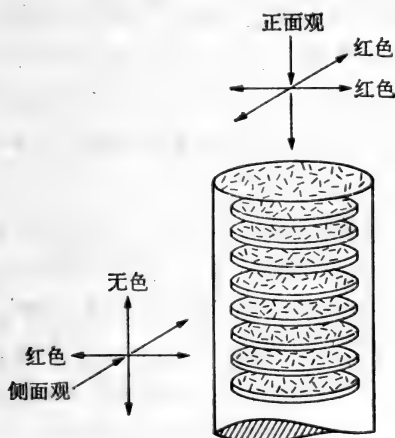


图 10-12 这是一幅示意图，说明当以偏振光照明从侧面看视杆外段时，有圆二色性，从一端看时无圆二色性（详见正文）。视紫红质生色团的排列是高度受限制的：它们全部位于圆盘膜平面内；而在此平面内的取向则是随机的。

脂基质为视紫红质的运动提供了一种较为流动的介质。视紫红质的扩散常数可用于估计膜平面中的有效粘滞系数，它大约为  $2P$ ，与大部分橄榄油的粘滞系数相当，而为水粘滞系数的 200 倍<sup>[21-23]</sup>。戊二醛固定能使视紫红质的转动和移动停止。并且，虽然视紫红质仍能被漂白，仍能经历其正常的构象变化，但网膜的感受器电位却因戊二醛固定而消失(见 10.4.5 关于早期感受器电位的讨论)。虽然对固定造成的结果可以有很多解释，但是最有吸引力的还是认为光激发要求视紫红质分子在膜的平面内运动的假说。

### 10.3.3 视色素光谱的波长调节问题

VPs 吸收峰范围相当宽，相当于  $0.75\text{ eV}$  的生色团激发能差。这样宽的范围部分地是由于有两种稍有不同的生色团  $A_1$  和  $A_2$  造成的。但是  $A_1$  色素本身的范围就接近  $0.5\text{ eV}$  ( $430-575\text{ nm}$ )，就单种生色团来说这已经相当大了。在不同 VPs 中，生色团结合位置周围不同蛋白质环境或多或少地引起生色团吸收峰由蓝向红移动。蛋白质对生色团的这种影响叫作波长调节。其机理还不清楚，但是已经提出几种假说来解释这个现象。

同样的 VP 蛋白质，当与  $A_2$  生色团耦联时，VP 吸收的波长要比与  $A_1$  生色团耦联时吸收的波长要长。如果用数种 VPs 作  $A_2-A_1$  位移的比较，则发现对吸收远红光的色素来说这个差别最大，而对吸收移向蓝光的色素来说，这个差别就变小。实际上， $A_2-A_1$  位移对  $A_1\text{VP}$  或  $A_2\text{VP}$  的最大吸收峰作图，得到平滑的近直线结果，而且  $A_2-A_1$  之差在短波端会聚到接近 0。这种现象叫作“会聚”。

在多种鱼中，吸收峰似乎“成簇”地位于某些不同波长的附近<sup>[24]</sup>，见于图 10-13 中的直方图。这种现象说明生色团在

VPs 中的环境的变化也是不连续的。高峰最经常出现在 500 nm 处。在海平面上太阳的光谱峰大约在 520 nm 处, 在水深 20 m 处, 光谱峰变为 500 nm, 在约 50m 深处则降为 480nm<sup>[25]</sup> 了。在很多种脊椎动物的视杆中, 最常见的吸收峰位于 500 nm 附近(例如牛为 498nm, 蛙为 520nm)。

与分离的生色团比较, 视紫红质的希夫碱基键的质子化引起较大的红移(见 10-9 结构 VI 及图 10-10)。喇曼共振光谱学实验已证明视紫红质中希夫碱基键是质子化的。与质子化的希夫碱基配对的离子的性质对光谱峰有很大影响。羧基可能是蛋白质环境中唯一可以利用的阴离子, 阴离子性质的变化可能不足以解释吸收峰范围之宽。

在某些溶剂中, A<sub>1</sub> 的质子化的希夫碱基的吸收峰红移至大约 500nm, 但是永远不会转移到最红的 VPs 的吸收峰处

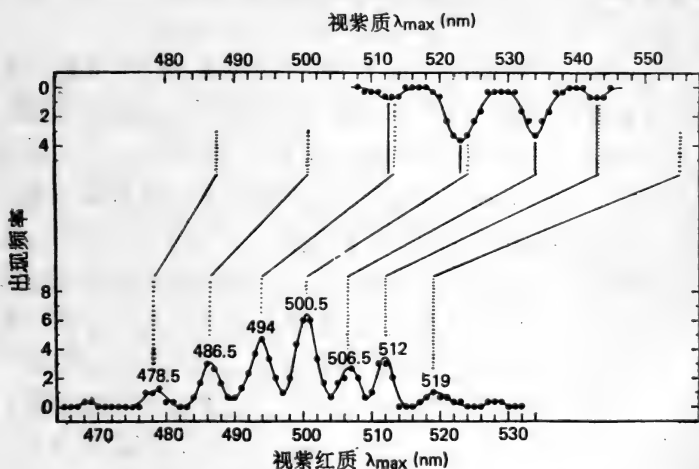


图 10-13 硬骨鱼视网膜的视紫红质(生色团 A<sub>1</sub>)及视紫质(生色团 A<sub>2</sub>) 吸收峰的簇状分布。平滑的实线是通过各数据点画出的。用线连接起来的视紫红质和视紫质高峰对, 是根据 A<sub>1</sub> 色素和 A<sub>2</sub> 色素吸收峰的经验关系得到的, 而此关系是从各种动物的色素对推导出来的(引自参考文献 61)。

(约 575nm)。已经证明,如果蛋白质能把第二个阴离子(或偶极子)加在视黄醛的环端附近,那么此蛋白质就能引起大的红移(图 10-9)<sup>[26]</sup>。因此,不同颜色的 VP<sub>s</sub> 中视黄醛的环和第二个电荷之间的距离不同。

蛋白质使 VP 生色团在  $\alpha$  带和  $\beta$  带有大的圆二色性(CD),这说明生色团的环境是不对称的,而且蛋白质内的这个环境是有倾向的。现在对 CD 的起因还不清楚。把 CD 和对生色团吸收峰的控制(波长调节)结合起来研究,比单独用一种方法去研究能有更大的成功机会。牛的视紫红质及吸收光后的两种产物光视紫红质及异视紫红质的  $\alpha$  带、 $\beta$  带 CD 很相似<sup>[27]</sup> (见 10.4.1)。给这个谜找到答案是未来研究工作的课题。下面的内容中就包括这类研究的一条可能的途径。

### 10.3.4 生色团类似物

比较自然产生的视色素 A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub> 的性质,对 VP 光谱理论提供了检验的标准。除了 11-顺异构体以外,这些生色团的 9-顺和 9、13-2 顺异构体也能与蛋白质形成色素。一些时间以来化学家们一直在合成键长、立体性质和构象限制等都不相同的维生素 A 醛的类似物。已经发现,在接受何种其它生色团方面,视紫红质的结合位置是十分局限的。长些或短些的多烯分子都不能形成 VP<sub>s</sub>,必须有 6 碳环存在,环中的 O 和 3 个双键之间任何地方都可以被接纳。形成 VP<sub>s</sub> 不需要甲基,可是某些失去甲基的类似物却没有天然生色团结合得牢固。由 9-去甲基(图 10-9 结构 I 缺少 9-甲基)形成的色素的吸收光谱峰和 CD 的强度都与天然生色团有很大的差别。与天然生色团比较,大多数结构变化了的生色团与蛋白质生成的色素都是不稳定的,而且光敏性下降。对这方面大部分工作已有综述<sup>[28, 29]</sup>,详细讨论这些结果已经超出本章的范围。

我只想强调在研究蛋白质和生色团相互作用方面，视黄醛类似物是非常有用的。

### 10.3.5 光化学

视紫红质激发的量子效率非常高，接近 0.67。在 10.3.1 中已经指出视紫红质的漂白引起生色团由 11-顺异构体(图 10-9 中结构 II)向全反构象(图 10-9, 结构 III)的异构化。吸收光子后引起的构象变化又引起了本章下一节将讨论的一系列变化。吸收一个光子后，脊椎动物光感受器的一系列其它变化都发生在黑暗中，因此这个体系的光化学的中心问题就是异构化机理以及异构化是通过单线态途径还是通过三线态途径产生的问题。视紫红质中第一个可测的光谱变化在短于 6 ps ( $6 \times 10^{-12}$  s) 内出现。虽然这个观察结果并没有解释机理，但它排除了蛋白质结合位置同时发生较大变化的可能，而且说明把分离的生色团作为模型来研究蛋白质内所发生的早期过程可能是有益的。似乎，视黄醛至少部分地通过三线态机理发生异构化。虽则 11-顺视黄醛在溶液中主要是通过三线态机理异构化的，但质子化的希夫碱基却能更迅速地通过单线态机理发生异构化<sup>[30]</sup>。这说明视黄醛对研究视紫红质的光化学可能不是一个好的模型，而质子化的希夫碱基则具有重要的不同的性质。

## 10.4 光刺激的可测反应

### 10.4.1 “漂白”中间产物的光谱及其性质

视紫红质受光照后经历一系列变化，颜色也从原来的粉红色经过一些步骤而变为黄色。如上所述，这一整个过程叫作“漂白”。图 10-14 给出漂白过程的一系列已经证实的中间

产物、它们的最大吸收峰以及在视网膜中或分离的外段内当温度为 20℃ 或 37℃ 时的半转化期。第一个变化——从视紫红质到前光视紫红质——是由光诱发的，所有其它的变化都是暗反应。所有的中间产物都能发生光逆反应而重新形成视紫红质。然而有人提出，有一种间视紫红质(称为 meta I', 在 meta I 之后形成)不能在光照下变回为视紫红质<sup>[1]</sup>。因为存在着光逆反应，所以单次闪光，不管它多么亮都不能使所有的视紫红质漂白。在一次饱和闪光中漂白量与下面几个因素有关：视紫红质及中间产物在闪光全部光谱上的相对积分吸收本领，光逆反应的量子效率，以及闪光长短比较中间产物的寿命。中间产物的寿命，可能还有光逆反应的量子效率，都和视紫红质的环境有关。例如在多种去垢剂中，meta I → meta II 的反应速率加快约 1000 倍。在这些去垢剂中，经一次 1 ms 的闪光几乎就能达到完全漂白。相比之下，在完整膜的类脂环境中，经过一次亮闪光，很难做到漂白 50% 以上。

光谱变化的动力学过程与温度有相当密切的依赖关系。鼠的视网膜在 37℃ 时 meta II 出现的半转化期为 0.25 ms，低于 0℃ 时 meta II 出现的非常慢。而 meta I 可用改变温度的方法在低于 -15℃ 时扑获。研究得比较仔细的牛视紫红质有同样的与温度有关的动力学过程，但也有某些差别。例如温度低于 -40℃ 可得到光视紫红质，低于 -140℃ 时才能得到前光视紫红质。前光视紫红质也可在液氮温度(-196℃)形成，在此温度下，还有光逆反应，再变为视紫红质。但某些 9-顺色素(在牛视紫红质中， $\lambda_{\text{最大}} = 486$ ，称为异视紫红质)也是在这种条件下的逆反应中形成的。把在 -196℃ 时形成的前光视紫红质放在室温下黑暗中，它们就完成了漂白过程。称为视紫蓝质的鸡视锥细胞色素则不同，在 -196℃ 时形成的前光视紫红质，温度升高后又变回为视紫蓝质。



在 meta I  $\rightarrow$  meta II 的过渡中, 视紫红质吸收一个质子。这是很奇怪的, 因为 meta II 视紫红质的吸收光谱与未质子化的希夫碱基类似。而 meta I 视紫红质的吸收光谱与质子化的希夫碱基类似。因此似乎在 meta II 形成时生色团失去一个质子, 而在由 meta I 向 meta II 的过渡中, 蛋白质一定吸收了这个质子。

在 5°C 时可以观察 meta I/meta II 比例随改变 pH 值的变化, 因为在此温下 meta II 的寿命有数小时之久。在酸性液

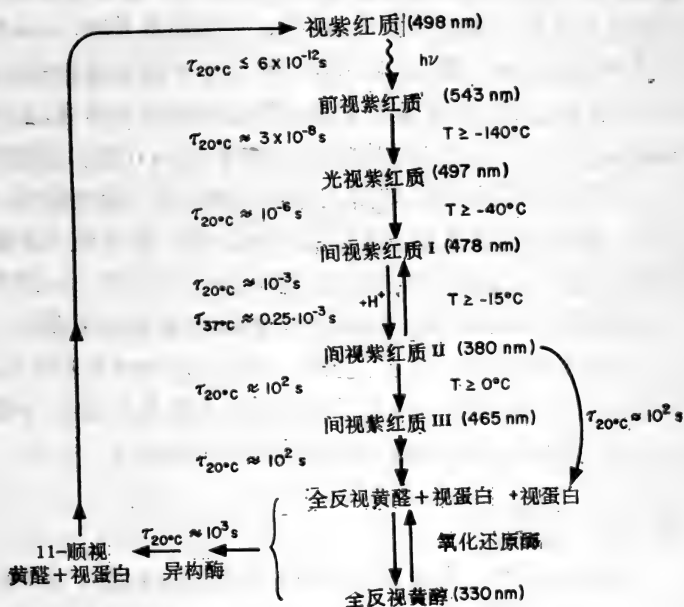


图 10-14 视紫红质的漂白和再生过程。原初光事件表示为波形线, 以下的热力学暗反应以实线表示。每一中间产物的最大吸收峰表示在名称后面的括号内, 这些值是用牛视紫红质得到的。  $\tau_{20^\circ\text{C}}$  和  $\tau_{37^\circ\text{C}}$  分别近似地为各中间产物在 20°C 和 37°C 时的半转化期。大写字母 T 表示发生转化的大致的温度阈值。由间视紫红质 I 向间视紫红质 II 的转化, 由 III 向全反视黄醛 + 视蛋白的转化和由全反视黄醇向 11-顺视黄醛的转化各自都又包括若干步骤。

中 meta II 占优势,此时比值遵守 Henderson-Hasselbalch 平衡式,其中  $p^k$  近似于 6.5。在较高的温度下 meta III 和以后的产物就都形成了。在 meta III 以后形成的漂白产物的颜色也与 pH 有关,其变化方式似反映了视黄醛希夫碱基键的各种质子化情况。

当视紫红质位于盘膜类脂环境中时,在温度为 5℃ 时 meta I 与 meta II 的比值也与压力有关<sup>[32]</sup>。施加压力,meta I 增加,meta II 减少。在大约为  $2.8 \times 10^6 \text{ kg/m}^2$  的压力下 meta I  $\rightleftharpoons$  meta II 的平衡完全翻向 meta I。这些观察表明,meta II 的形成导致膜体积膨胀。这种体积膨胀有赖于膜中类脂-蛋白相互作用,因为如果把视紫红质提取到去垢剂胶束中去,就没有这种压力效应。在去垢剂提取物中形成 meta II 时,视紫红质还让另外某些硫氢基团暴露在外并与硫氢基反应物作用。相反地,盘膜中的视紫红质在形成 meta II 的时候并没有暴露出硫氢基团<sup>[33]</sup>。这些说明去垢剂提取物并不是研究 meta II 形成时的视紫红质性质的适当的模型,膜环境是非常重要的。视紫红质漂白的前期各阶段,包括由 meta I 向 meta II 的转化,是特别有意义的,因为 meta II 形成以后的光谱变化太慢,不能解释由光的吸收到视觉兴奋之间短暂的时间延迟。

#### 10.4.2 视觉循环

视紫红质的漂白导致慢慢地释放全反视黄醛。在眼内,酶促全反视黄醛转变为 11-顺视黄醛,从而产生漂白的视紫红质。11-顺视黄醛又能与漂白的视蛋白自行结合,重新生成视紫红质。在形成 11-顺视黄醛过程中有很多中间步骤,这些已被表示在图 10-15 中。从视紫红质被漂白到其再生的整个过程叫作视觉循环。在剥离的视网膜,提纯的 ROS 中,或去垢剂提取液中很少有或者说不能自发再生。而如果在漂白的

视紫红质所处的膜环境中，或在少数几种去垢剂中的某种内（例如毛地黄苷，Tween-80 或烷基葡萄糖苷内）加入 11-顺视黄醛，就可以有再生。大多数去垢剂并不有助于 11-顺视黄醛再生为视紫红质。如果膜内含有磷脂酰乙醇胺，则视黄醛和其它醛类使膜能透过离子，但是相应的醇类没有这种作用<sup>[34]</sup>。ROS 膜有丰富的磷脂酰乙醇胺。在膜中漂白时并无视黄醛的积累，因为氧化还原酶的活动（见图 10-14）迅速地把它们还原为视黄醇（图 10-9 结构 IV），同时消耗掉还原型磷酸尼克酰胺腺嘌呤核苷（NADPH）。在分离的 ROS 中仍有某些视黄醛还原活动，但 NADPH 则已大部分消耗光了。

在视循环中，视黄醛形成以后的过程的详细情况还没有弄清楚。如果大量色素被漂白，视黄醛就还原为视黄醇，再被脂化为脂肪酸，运送到色素上皮。视循环通过变为 11-顺的异构化、再回到 ROS、酯水解以及视黄醛氧化而完成；但这些过程的位置和顺序还不完全清楚。如果视色素的漂白在接近生理光照水平顺利地发生，那就证明有一种“短程视循环”存在。在这个循环中视黄醛不离开 ROS 就发生异构化<sup>[35]</sup>。给脱离色素上皮的视网膜供以葡萄糖和一些简单的盐类，并不能使被漂白的视紫红质发生再生。但如果将剥离的视网膜保持在一个小室内，会有很慢的再生活动<sup>[36]</sup>。很显然剥离的视网膜失去或冲稀了某种因子，而这种因子是视循环中再生所需要的。为了找出视循环中的这种因子及色素上皮的作用，还需要进一步的工作。

### 10.4.3 心理物理学和作用光谱

研究感觉系统的一种有效的方式就是让完整动物以某种方式“报告”它检测到了什么，或者它实际上是否检测到实验者精心设计的刺激。这种方法叫作心理物理学方法。另外一

种光生物学常用的有效方法是测量反应的量子效率，把它作为激发波长的函数。测得的曲线叫反应的作用光谱(见 1.5.4 和3.7)。

已经用心理物理学方法在多次实验中证明了视觉作用光谱与存在的视色素的吸收光谱完全一致。在只含有视杆细胞或只含有视锥细胞的视网膜中这种测量是很简单的，但是在既有视杆细胞也有视锥细胞的混合视网膜中就复杂得多了。

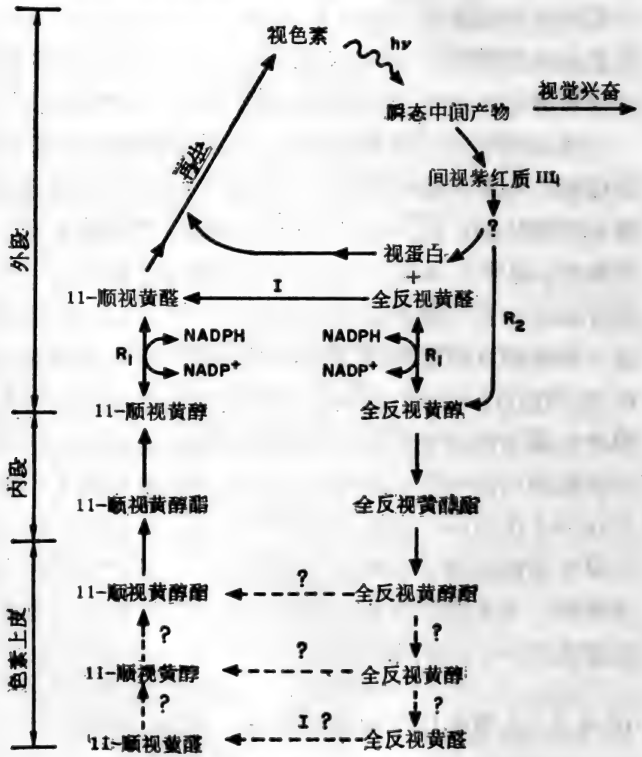


图 10-15 视觉色素在眼内视循环的路线。以实线表示的反应是已证实的，虚线表示的反应是否存在于生理光刺激条件下还不能肯定，每种反应发生的部位表示在左侧。I 指异构酶， $R_1$ ,  $R_2$  为视黄醛氧化还原酶。

混合视网膜的敏感性在暗光下与视杆细胞的 VP 吸收光谱相符,在亮光下与视锥细胞的吸收光谱相符。经亮光刺激之后,光感受器的敏感性明显地下降,这种现象叫作光适应。有一种熟知的经验,当从暗光环境进入亮光照明的环境中时会暂时地有视觉盲现象,而后很快地就适应于在此亮光下视物了。类似地,由亮光环境进入暗光环境时,光感受器敏感性增加,这种现象叫作暗适应,也是日常生活中熟知的经验。

暗适应的动力学过程很复杂。视锥细胞敏感性恢复很迅速,但是它们的活性似乎却压抑了视杆细胞的恢复<sup>[49]</sup>。视杆细胞敏感性恢复比视锥细胞慢得多,其半恢复期约为 5—8 min。视杆细胞完全暗适应需要 30 min。了解光适应和暗适应的机制尚需要更多的光感受器内部机制方面的知识。

#### 10.4.4 视网膜电图 (ERG)

可以用几种方法测量光感受器对光的电反应。一种简单而有效的方法是跨完整动物眼测量它对光刺激反应产生的电位,用解剖下来的眼或视网膜也可以。这些电位叫作视网膜电图(ERG),可以用粗电极(例如用盐水浸湿的棉线)或细胞外微电极测量。可以把这些反应分离为几个组分,其中有起源于光感受器的(a波或称为 PIII),起源于视网膜深层的(b波)以及起源于色素上皮的(c波)。

在剥离的视网膜中加天冬氨酸钠可以把 a 波分离出来,因为这种氨基酸盐可以使位于感受器以下的水平细胞钝化<sup>[37]</sup>。a 波对缺氧和缺葡萄糖极为敏感,说明需要氧化能源。另外 a 波可因缺  $\text{Na}^+$  和增加  $\text{Ca}^{2+}$  而受到抑制。a 波在光刺激之后延迟几毫秒才出现。

#### 10.4.5 早期感受器电位 (ERP)

很强的闪光刺激能引起一个探测不到有任何延迟的电位<sup>[38]</sup>。此反应叫作早期感受器电位(ERP)。ERP与a波不同,它有很高的耐缺氧能力,并且与环境中的盐的关系并不严格。ERP与被漂白的视紫红质质量有线性关系,而视网膜产生的其它电位则与被漂白的视紫红质质量有非线性关系<sup>[39]</sup>。利用漂白的中间产物的光逆反应已经证明,可以用ERP来监视视紫红质中间产物之间的互相转化<sup>[40]</sup>。

Hagins 和 Ruppel<sup>[41]</sup>证明 ERP(他称为快光电位或FPV)似乎与电荷跨视杆细胞原生质膜的移动相对应。可能在漂白中间产物互相转变过程中视紫红质改变了构象,而这种构象变化导致电荷跨膜分布的变化。脱落膜盘中的视紫红质对ERP没有任何净电位贡献,因此ERP仅仅是外包原生质膜(当然也包括视杆外段基部没脱落的圆盘)内的视紫红质变化引起的。漂白以后的光谱变化主要是由于膜盘内视紫红质变化的结果。因为ROS膜中97—99%的面积都是圆盘膜。光谱和ERP变化的动态过程不论是正向的还是反向的都非常相似,这一点说明在圆盘内和原生质膜内的视紫红质性质相似。

ERP研究对于了解视觉兴奋的机制几乎没有什么贡献,但是它确实表明漂白以后视紫红质经历了构象变化,特别是在meta II形成时发生的构象变化更为明显。在10.4.1中讲到的压力实验和化学反应实验中已测出形成meta II时有构象的变化。Meta II视紫红质形成相当快,它是与视觉兴奋有关的并且已经测出光谱的最后中间产物。meta II以前的所有中间产物都是在由明胶底片中的毛地黄皂苷胶束制备的干系统中形成的。如果把曝光的底片在黑暗中水化,就形成meta II。因此meta II又是需要有水环境的第一个中间产物。所有这些

都说明在形成 meta II 时产生重要的构象变化,而且 meta II 的形成可能是触发视觉兴奋的首要步骤。

#### 10.4.6 细胞内记录的光感受器反应

所谓细胞内记录就是把微细玻璃管电极刺入一个细胞内,直接测量跨细胞膜的电位。在微细玻璃管中充以浓盐溶液,提供电的接触。细胞内记录对了解各种细胞特别是神经细胞和肌肉细胞的电学性质及离子流一直非常有用。光感受器细胞比较小,细胞内记录很困难,然而近几年技术的改进使得可以在几种光感受器大的动物视网膜上作细胞内记录。对视网膜深层接受光感受器刺激的其它细胞也作了大量细胞内记录研究<sup>[42]</sup>。

对逐渐变化的光刺激,光感受器并不像轴突那样产生峰电位,而是产生平稳的逐渐变化的反应<sup>[5, 37, 43]</sup>。光感受器像所有其它细胞一样,细胞内为负电位,但是它们对光反应时发生超极化(细胞内变得更负)而不是去极化。视网膜深层的水平细胞和双极细胞对刺激的反应也是逐渐的去极化。神经节细胞的反应性质和“标准”的神经元一样,对刺激的反应为去极化,其输出是由一串峰电位组成的。

通过研究光谱敏感性、饱和特性和记录之后所作的细胞内染色标记证明,对视锥细胞和视杆细胞都能进行细胞内记录。与视锥细胞比较,视杆细胞电反应的动力学过程要慢得多,特别是在一短暂刺激之后的恢复时相。视杆细胞也接受附近视杆的会聚信号,这种信号的会聚是视杆视觉高敏感性的原因之一,当然它也导致视杆视觉的视敏度(空间分辨率)下降。如果对邻近较大面积上的视杆细胞施以刺激,那么单个视杆细胞在大大低于 1 个量子/视杆细胞的水平就能产生可检测到的信号。在此强度以上,视杆细胞的反应振幅饱和,

并且随着超饱和刺激的增强,其恢复变得越来越慢。光感受器电压反应的幅度遵循如下关系式:

$$\Delta V / \Delta V_{\max} = I^n / (I^n + K^n),$$

这里  $\Delta V$  是电压反应,  $I$  为刺激强度,  $n$  为一常数, 随光感受器不同而在 0.8—2.0 的范围内变化,  $K$  是产生半饱和的刺激强度, 其值大约为 30 个量子/视杆细胞。

暗适应的视锥细胞在大约每个细胞吸收 100 个光子的时候出现可测到的反应, 所要求吸收的平均光量子数随强度而增加, 一直到每个细胞  $10^4$ — $10^5$  个光量子<sup>[43]</sup>。半饱和强度  $K$  约为 1200—1300 个光量子。这些数字都是近似的, 但是, 很明显可以看出视锥细胞的敏感性比视杆细胞要低得多。在有背景适应光的情况下, 视锥细胞就失去敏感性, 而且有的甚致只对背景光以上  $10^8$  个光量子/视锥细胞才有可检测的反应。视杆细胞和视锥细胞两类感受器一起使可检测的有用强度变化范围为  $10^{10}$  倍。

#### 10.4.7 细胞外微电极记录

Hagins 和他的同事<sup>[44]</sup>建立了一种方法, 用以在解剖下来的视网膜上测定电流的空间定位。这种方法就是在两个低阻抗的微电极之间测量细胞外电压梯度。细胞外介质的阻抗虽小, 但不可忽视。在组织的两个区域各放一个电极, 两区之间的电流就在两个电极间产生一个小的电压。可用电压梯度沿光感受器的空间分布来确定电流源和汇的位置, 并测量这些电流的大小。

在无脊椎动物的视网膜中, 有光时流入光感受器外段的钠电流增加<sup>[45]</sup>, 而在脊椎动物, 情况恰好相反<sup>[5,44]</sup>。例如鼠视网膜在黑暗中有一大的  $\text{Na}^+$  电流 ( $10^7 \text{ Na}^+/\text{视杆} \cdot \text{秒}$ ) 由内段流向外段, 而光则能降低这个电流。每个视杆细胞吸收一个



光子可降低电流约 1%。这种下降一直到最大反应的一半,即接近每个视杆细胞吸收 30 个光子处,都是线性的。而对闪光刺激的整个反应曲线遵循关系式  $V/V_{\max} = I/(I + 30)$ ,与在其它视杆细胞内记录的结果类似。

Yoshikami 和 Hagins<sup>[46]</sup>发现高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (约 10mM) 能反过来模拟光压抑光感受器  $\text{Na}^+$  电流的作用。他们提出  $\text{Ca}^{2+}$  是控制  $\text{Na}^+$  通透性的细胞内信号,而细胞外施加  $\text{Ca}^{2+}$  不能很有效地进入细胞内。在有奥巴因(一种  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -ATP 酶抑制物)存在时  $\text{Na}^+$  暗电流下降,而光照或加细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  能减慢此下降速度。 $\text{Ca}^{2+}$  可能是视觉兴奋的细胞内信号,这就是“钙偶联”假说。在 10.5.3 将对此作进一步说明。

#### 10.4.8 通过渗透压反应测量的视杆外段离子电流

分离的新鲜蛙或鼠的 ROS 经超渗处理后迅速地收缩<sup>[47]</sup>。在大多数盐溶液中,视杆细胞仍处于收缩状态,但在 NaCl 溶液中在黑暗条件下,它们却能迅速恢复到原来的长度。如果在 NaCl 溶液中,收缩了的视杆细胞受到光的照射,或在此溶液中同时也有高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  (10mM) 存在,那么它们的长度就不能恢复。这个实验及其它一系列实验表明光和细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  能够控制流入外段的  $\text{Na}^+$ 。如果制备液内 ROS 浓度不高,或 ROS 存在的时间自网膜被解剖下来算起超过 15 分钟,则超渗 NaCl 处理后的恢复就不出现了。

似乎在视杆细胞圆盘之间 15nm 的空间上有一个“弹簧”,当高浓度盐存在时,这个空间就破坏了,在黑暗中 NaCl 溶液内又恢复了 15nm 的间隔。这是用冰冻刻蚀方法测量盘膜间隔证明的。在黑暗中 ROS 原生质膜是能透过 NaCl 的,因而使它从超渗引起的收缩状态下恢复。由恢复速度可以计算出:在黑暗中每秒有  $10^9$  个  $\text{Na}^+$  通过每一视杆细胞的原生质膜,

而每个视杆细胞吸收一个量子就可降低  $\text{Na}^+$  通透性的 1—3%<sup>[47]</sup>。

#### 10.4.9 人工类脂膜内的视紫红质

黑脂膜 (BLM) 是一种宏观的双层类脂膜,它是在把两个盛水小室隔开来的特氟隆片上的一个小圆孔的两边形成的。因为用反射的白光照明观察时,这种双层膜是黑色的,因而叫黑脂膜。可以把视紫红质参入到 BLM 中去<sup>[48]</sup>。视紫红质放到膜的两侧并不稳定,如果仅放在一侧可以得到异常稳定的膜。与天然的盘膜相比较,这个性质是很有意思的,因为正如我们在 10.2.3 中讨论过的,冷冻蚀刻和化学标记实验证明盘膜中视紫红质并非对称排列的,而是具有外向的不对称性的。

因为可以较易于测量电导,BLM 系统特别有用。在黑暗中,视紫红质对膜的电导并无很大影响。然而光刺激之后,含视紫红质的膜的电导显著增加。现在还没有关于光诱发电导的离子选择性或单通道电导的报道。

现在已经可以把提纯的视紫红质重新装进用各种各样的磷脂做成的类脂小泡中去<sup>[49-51]</sup>。视紫红质在这些小泡中不具有天然盘膜的非对称性,而是对称地排列在双层膜的内外。如果用这样一种类脂,它在适当的实验温度下就由固相变为液相,在相变温度以下,视紫红质就被从纯固态的类脂中挤出去,但是被漂白的视紫红质在某些情况下仍然分散在其中<sup>[50]</sup>。由自旋标记测量推测,视紫红质能降低类脂碳氢链的活性<sup>[49]</sup>。去垢剂能大大地加速由 meta I  $\rightarrow$  meta II 的动力学过程,而且在这种重新组成的系统中,这种动力学过程可以恢复到接近其天然速度<sup>[54]</sup>。重新做的系统可以对视紫红质的类质环境提供实验控制,这在多种实验中都是很有用处的。

## 10.5 视觉兴奋和适应的机制

### 10.5.1 内传递介质假说

视杆细胞的拓扑结构说明一定有一种细胞内“传递介质”把信号从圆盘上吸收光的位置带到原生质外膜上  $\text{Na}^+$  电导变化的位置。只有在视杆细胞基部新形成的圆盘与原生质膜连接在一起,大多数圆盘都已经脱落,不与原生质膜连接。原生质膜只占外段全部膜面积的 1—3%,其余的 97—99% 都是圆盘膜。又因为视紫红质在原生质膜上不可能比在圆盘上堆积得更密,所以大部分视紫红质都在圆盘上。鉴于视杆细胞是非常敏感的,那些不与原生质膜连接的圆盘也必然被用来引起细胞反应。这种论点要求在圆盘和原生质膜之间有一种信号或“传递介质”。这个信号似乎极不可能是一种强电耦合,因为那样圆盘就需要接受或释放足够的离子以参与产生膜电位。关于不可能是电耦合的更详细的讨论可以参阅文献<sup>[5]</sup>。视杆细胞的高敏感性与细胞内传递介质是化学物质并对应着原生质膜上的特异的受体的看法是一致的。即使只释放或接受极少量这种特异的传递介质,它们与原生质膜上特异位置结合,就能影响膜的  $\text{Na}^+$  通透性。

### 10.5.2 传递介质的必备条件

要改变传递介质在原生质膜上的浓度,圆盘释放或接受它的速度就必须相当快,这个时间与对弱闪光的峰反应时间(100—200ms)相当。

吸收一个光子之后,就必须吸收或释放足够量的传递介质,只有这样才能检测出高于视杆细胞本底泄漏和原生质膜电导热噪声的传递介质浓度的变化。几个方面的理论分析说

明这个数目必须大于 100—1000 个传递介质/光子。

传递介质一定要结合在原生质膜上，而这种结合一定会影响  $\text{Na}^+$  电导。在黑暗的情况下实验性地改变传递介质浓度应该与光的作用类似。

在黑暗中传递介质的浓度必须很快地回到其初始水平，只有这样才能解释原生质膜电压的恢复速度。用暗光刺激时其半恢复期为 0.15—0.5 s，而用亮光刺激时这个时间要长得多。

盘膜上的视紫红质必须以某种形式控制光照下传递介质的水平，这可能通过如下方式实现：①结合传递介质的表面的变化；②控制传递介质水平的酶活性的变化；③视紫红质作为一种跨膜载体的性质的变化，这种变化能保证传递介质从圆盘内向外以一定速率输运；④它作为一种穿膜细孔的性质的改变，这种改变引起传递介质从圆盘内释放。

因为光感受器细胞的敏感性非常之高，很可能细胞内传递介质在暗适应时浓度很低，并且光激发的视紫红质引起这一水平的升高而不是引起其降低。按这种方式，传递介质绝对量有很小的增加就能引起其比例有较大的变化。因为蛙视杆细胞每吸收一个光子就要关闭大约  $10^7$  个  $\text{Na}^+$  通道/视杆，所以传递介质需要有很大的增益。

### 10.5.3 钙作用的证据

钙在光兴奋中似乎起某种作用。尽管还没有证明，但很可能 ROS 中的内传递介质就是钙。在 10.4 中已经提到，高浓度的细胞外钠，如为 10mM 量级就能模拟光的关闭流过原生质膜钠电流的作用。但是用解剖下的鼠视网膜实验，如果加一种叫作 X 537 A 的跨膜离子载体，则微克分子水平的细胞外钙就可以模拟光的作用了<sup>[52]</sup>。这个观察对钙耦联假说是一个

有力的支持,但还没有以应有的简单方法肯定地证明它的作用。离子载体 X 537 A 的特异性相当低,除  $\text{Ca}^{2+}$  以外它也能运送很多其它离子。在把  $\text{Ca}^{2+}$  运进的同时, X 537 A 也倾向把其它阳离子带出来。有证据说明质子可能是视觉兴奋的原初触发因子,而  $\text{Ca}^{2+}$  水平的变化只是光激发的次级结果。可能在外  $\text{Ca}^{2+}$  低的情况下,加一点 X 537 A 会从圆盘上移去  $\text{Ca}^{2+}$ ,从而消除视杆细胞对光的敏感性。在有 X 537 A 的低钙液中视杆细胞的光敏性持续至少 20 分钟不衰减<sup>[52]</sup>。离子载体 A 23187 对二价离子有较大的特异性,但还没有用此种离子载体进行研究的报道。

各种各样的研究工作者作了大量的努力去证明在光照下  $\text{Ca}^{2+}$  被从圆盘上释放下来,在黑暗中被结合上去。几个研究证明在黑暗中  $\text{Ca}^{2+}$  被 ROS 片断吸收,但是未能证明在同样制备液中光诱发  $\text{Ca}^{2+}$  的释放。在这些制备液中混有线粒体可能是一个问题,因为线粒体极能吸收  $\text{Ca}^{2+}$ ,而且当然不会因为光再把它们释放出来。几个小组已证明光诱使  $\text{Ca}^{2+}$  释放,但这些作用的量子效率非常之低( $\leq 1$  个  $\text{Ca}^{2+}$ /光子)。最近的评论已更为详细地谈到了  $\text{Ca}^{2+}$  的可能作用<sup>[5,49,53]</sup>。很显然,需要更多的工作来充分鉴别传递介质,还需要发展一种方法检验传递介质的释放。在这个领域内,研究者正在确定视紫红质起什么作用,一旦解决了这个问题,就可能确定它如何起作用了。

#### 10.5.4 与光刺激有关的酶的活动

已经发现,当视杆感受器细胞受到光照兴奋时有几类酶活性变化,虽则大多数变化似乎太慢,不能解释视觉兴奋,但是它们可能与敏感性控制有关(光适应、暗适应)。然而也有的变化很迅速,可能与兴奋有关。

为了在刺激之后使系统复原,大多数内传递介质机制都需要主动地把光释传递介质转移开,而且这种过程又是和能量有关的。因此在 ROS 中与能量有关的过程是热门的研究课题。在蛙 ROS 片断的制备液中已经测出一种  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  的 ATP 酶<sup>[54]</sup>活性,其中一小部分( $\sim 15\%$ )可重新产生,并且为光照所抑制。这说明至少这一部分活性位于 ROS 内。总活性的 80% 能被线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  ATP 酶抑制物消除,但是剩下部分的光敏感性还没有进行过测试。这种  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$  ATP 酶的作用物是 Mg ATP, 它为低浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (几微摩尔)激发,为高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  所抑制。各种形式的  $\text{Ca}^{2+}$  耦联假说都提出盘膜上有一种  $\text{Ca}^{2+}$  泵。视杆细胞对光的高敏感性意味着圆盘外传递介质(例如  $\text{Ca}^{2+}$ )的正常暗适应浓度很低。如果这种 ATP 酶就是盘膜  $\text{Ca}^{2+}$  泵,那么可以预料在低  $\text{Ca}^{2+}$  情况下它运转良好。ATP 酶的光敏感性反映了在光刺激时释放的高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  的抑制作用。Bownd 及其同事证明<sup>[55]</sup>,经过纯化之后 ROS 中的 ATP 酶活性降低,而且最纯的部分没有 ATP 酶活性。然而,ROS 中 ATP 酶的产生问题仍未解决,因为纯化过程本身就可能使这种酶失活。

不论在完整的动物还是在膜的制备液中(外加 ATP),在光照射下视紫红质就发生磷酸化。视紫红质底物有光敏感性,而磷酸化酶则没有,因为不论是在光照下还是在黑暗中这种酶都能使外源性的底物磷酸化。Kühn<sup>[56]</sup>提出磷酸化可能有增益控制作用,因为在完整的动物中,去磷酸化与暗适应有类似的动力学过程。有报道说 GTP 比 ATP 能更有效地使视紫红质磷酸化。

已发现在纯化的脊椎动物视杆细胞外段制备液中鸟苷酸环化酶<sup>[57]</sup>和环化磷酸二酯酶<sup>[58]</sup>有很高的活性,而这两种酶活性都对光敏感。光照后磷酸二酯酶的活性增加,而且在暗适

应的制备液中加少量完全漂白的 ROS 膜就能使其激活<sup>[59]</sup>。相反,有报道说鸟苷酸环化酶却受光的抑制<sup>[57]</sup>。完整动物网膜光照后环鸟化苷 5—单磷酸(cGMP)水平急剧下降<sup>[60]</sup>。cGMP 在光感受器中的作用还不清楚,鸟苷酸环化酶要求钙有一最佳水平,这种环化酶的活性在高钙和低钙时都有很大的下降<sup>[57]</sup>。虽然还没有作过钙激活与钝化的动态测量,但它们似乎是相当快的。很可能 ROS 中有一传递介质链,在其每一阶段上都以同样的增益工作。有证据说明其中一个链是  $h\nu \rightarrow H^+ \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow$  磷酸二酯酶,这里环化酶能使系统复原。

在由光向脑能进行处理的电信号的转换中,早期过程是一个颇有魅力的问题。了解这些过程以及光适应和暗适应机制的时机已经成熟了。

## 10.6 结 语

视觉系统是未来工作的肥沃土壤。现在未知的问题比已知的要多得多,但我们已积累了足够的知识来提出一些更好的问题。引起视觉色素有如此大的差异的机制还不清楚。我们对盘膜结构的了解还很肤浅,而且对光感受器原生质膜的结构还是知之甚少,甚至是一无所知。我们还不知道视紫红质起什么作用,因此对其作用的机制也还没有清楚的认识。大多数的组成和结构的资料只限于视杆细胞,而生物化学工作者几乎还没有触及到视锥细胞(颜色感受器)。

在光适应和暗适应情况下的敏感性控制机制问题还没有解决,虽然已经进行了某些有益的观察。在膜合成,翻折及其控制方面也有一些吸引人的问题,这些方面的研究工作正在积极地进行着;这里仅仅提一提。我们对视网膜和脑对视觉信号的加工几乎没有提到,而这方面的研究工作是相当活跃

的<sup>[61,62]</sup>。

可以期望,搜集视觉系统的基本知识会使我们对视网膜的医学问题有更深入的了解。例如已知视网膜光感受器退化症有很多种类型。这种病在老年人中是相当普遍的,但是其中某些类型同样地苦恼着老年人和青年人,例如色素性视网膜炎。正常的光感受器的一个令人感到意外的性质是它们可因光照而严重地损害<sup>[63,64]</sup>。对很多动物造成严重损伤的光照水平比人通常遇到的光照水平仅稍高一点。某些动物受到相当于晴朗的海滨照明的光照8h,或在正常的环境照明中2—3天就会造成严重的损伤<sup>[65,66]</sup>。动物实验证明,光致损伤在很大程度上是可逆的。但还没有资料说明重复的光致损伤是否有积累。

在黑暗条件下,分离提纯的视杆光感受器膜上的不饱和脂肪酸极易为大气中的氧所破坏<sup>[67]</sup>。在这种情况下,由于氧的存在使视蛋白永远失去再生的可能性。估计,光可能通过一种动力学机制促进氧造成的破坏。最近,一个俄罗斯研究组的报告证实了这一点<sup>[68]</sup>。

在分离的膜中,高浓度维生素E对减缓氧造成的破坏有所帮助。但是维生素E在空气中即被消耗,因此在完整系统中必然存在其它有效的机制对抗氧的破坏<sup>[67]</sup>。光感受器的代谢是很旺盛的,它们含有大量线粒体,一定会通过吸收周围介质中的氧而起作用。

但是对抗氧致损伤和光致损伤的有效保护机制也一定是有限度的。这大概就是稍高于通常的光照水平会造成动物光感受器损伤的原因。有些人经常遇到潜在的损伤性光照,它们可能造成积累损伤,这点在老年人中已有证明。可以预料营养因素(例如维生素E)对维持光感受器长期健康有一定的作用。比较严重的光感受器退化症可能是由于在正常时能有



效地防止类脂氧化的机制有遗传缺陷或疾病引起的。上述假说在医学上具有潜在的重要性，人们可以用现在关于光感受器的知识去检验它们。

(刁云程译 沈 恂校)

# 第11章 光形态建成

Walter Shropshire, Jr.

(史密森学院 辐射生物实验室)

11.1	序言 .....	339
11.2	光敏色素系统 .....	341
11.2.1	光敏色素,一种光致变色分子 .....	346
11.2.2	光敏色素的反应 .....	349
11.2.3	作用的原初位置 .....	352
11.2.4	高辐照度反应系统 .....	354
11.2.5	异化基因的激活 .....	357
11.2.6	和膜的相互作用 .....	358
11.3	蓝光反应 .....	360
11.3.1	光诱导的类胡萝卜素的合成 .....	360
11.3.2	光受体的性质 .....	361
11.4	藻类的光形态建成 .....	362
11.5	光形态建成的重要性 .....	366
11.5.1	光谱品质在自然环境中的重要性 .....	367
11.5.2	商业上和经济上的重要性 .....	369
11.6	结论 .....	371
11.7	实验 .....	372
11.7.1	实验方法 .....	372
11.7.2	光源材料及简评 .....	375

## 11.1 序 言

光形态建成是描述有机体对于光信号反应的一个集合术语，这些光信号在宏观水平和亚细胞及分子水平上调节着结构和形态的改变。如果机体在黑暗中发育，发育的速度和特异结构的大小与形状受其基因组的控制，而基因组又受某一酶作用底物和储存的食物的制约。但是，如果用光刺激机体，则发育的速度发生改变，并且产生出决定机体形态结构和形状的新的分子产物；例如，暗处生长的幼苗的叶片小而坚实，而光照下生长的幼苗的叶片则大得多，而且为了光合作用而有宽阔的表面以捕获最佳的光量；在某些菌类中，暗处生长的细胞几乎是无色的，而亮处生长的细胞有鲜明的颜色。就叶子的情况来说，细胞的增大和不断分裂改变了叶子的形状，而在菌类里，色素分子的合成大大加速了。两者都是光形态建成的过程。

之所以建立起来这些光形态建成反应，是因为它们给生活在周期性光照的环境中的有机体带来巨大的生存优势。植物和动物的形态发育和生理发育都受到光的调节，光不仅控制着为了从环境中吸取最佳数量的能量而形成的结构，而且也调节机体内能量流动的速度。

一般说来，光形态建成反应是一些受光调节的生长、发育和分化的过程。在这种调节控制中光的几个参数很重要：它们是光谱质量、照度、光照的频率和持续时间，以及光的空间对称性或非对称性。为了讨论方便，我们通常把光形态建成限制在那些光照是非周期性的和不定向的光反应。于是，像向光性这样的光运动，以及开花之类的光周期反应常常不属于光形态建成所讨论的范围。（参阅第 12 章关于光运动和

第8章关于生物钟部分)。然而,光周期反应和向光反应是在光照具有时间和空间不对称的特殊条件下生长和分化的表现。它们具有和光形态建成同样的色素系统,并且反应是通过生长发育来调节的。因此,我在适当的场合用它们作为有关光形态建成反应的信息源。

光形态建成反应有几个明显的特征:第一,为了产生可观测到的形态和结构变化所需要的能量不是从光信号本身获得的,而是由食物代谢得来的,光形态建成的光信号只不过是为了调节代谢的总速度而开启或关闭这些代谢反应。因此,可以把光形态建成看做是一种开关机制。

在光合作用中,由于希望捕捉和以化学潜能形式储存能量,所以吸收大量的光量子。然而,在光形态建成反应中仅仅吸收少量的光量子。与高辐照度\*的光合作用过程相反,这是低辐照度的光调节过程。因此,第二个特点是接收光信号以后,信号有很大的放大,最后在形态或产物的积累上产生一个可观察的变化。

第三,根据最有效的光谱区域,光形态建成反应可以人为地分成几类。例如,叶片增大主要是红光反应,而在某些菌类中诱发色素的形成主要是蓝光和近紫外光反应。我们把典型的光形态建成反应或者说成是红光反应或者说是蓝光反应<sup>1</sup>,在其它光谱区内也存在少数具有最大效率的光形态建成反应。

最后,光形态建成的光信号和机体内影响反应大小的某些因素相互作用。例如,机体内好像有能测定时间的内源振荡系统。如果植物在环境自然昼夜循环的午夜接受光信号,则对于调节花形成的形态建成反应这种光信号可能非常有

---

\* 这一章中所说的辐照度即为第1章中定义的能量注量率。——译者

效。但是,同样的光信号若在天刚黑或快天亮时给予,就可能完全没有效果。

同样,当有机体发育到不同阶段时,对于光信号的敏感性也存在着显著差别,这种敏感性的变化可能与许多因素有关,包括光形态建成上活跃的色素含量的变化或能迅速反应的结构效力的不同。

一般来说,在光刺激的大小(吸收的量子总数)和反应程度之间观察到一种定量关系。但是,在测量光形态建成反应以估价其与内源节律和发育方式相互作用的程度时实验上必须特别小心。

这种光调节过程在上个世纪就已经认识到了,但在分子水平上研究这些过程的仪器和技术只是到本世纪50年代以后才发展起来。这些光形态建成反应中研究最多的一个是光敏色素系统(因植物中所含的色素而得名),这是我要详细介绍的一个方面。已知许多生理反应受光敏色素的调节。已经描述过的反应数目现已超过100种<sup>[1,2]</sup>,并且包括像茎的伸长、种子萌发、叶片扩展以及叶绿素、叶红素和花青素合成等如此不同的过程。光敏色素是一个吸引人的系统,已有大量文献资料可查<sup>[3]</sup>,但这方面仍然有许多未解决的问题有待科学家们去竭力研究。

## 11.2 光敏色素系统

本世纪早期一些看上去完全不同的观察意外地结合起来了。植物生理学家早已知道植物在一年的不同时间开花,开花受白昼长短的影响很大<sup>[4]</sup>。因此,短日照植物,譬如菊花或大戟属植物,在秋天开花。实际上,这些植物都对黑夜的长度敏感,开花以前必须要有一段长而且不间断的黑暗时期。假

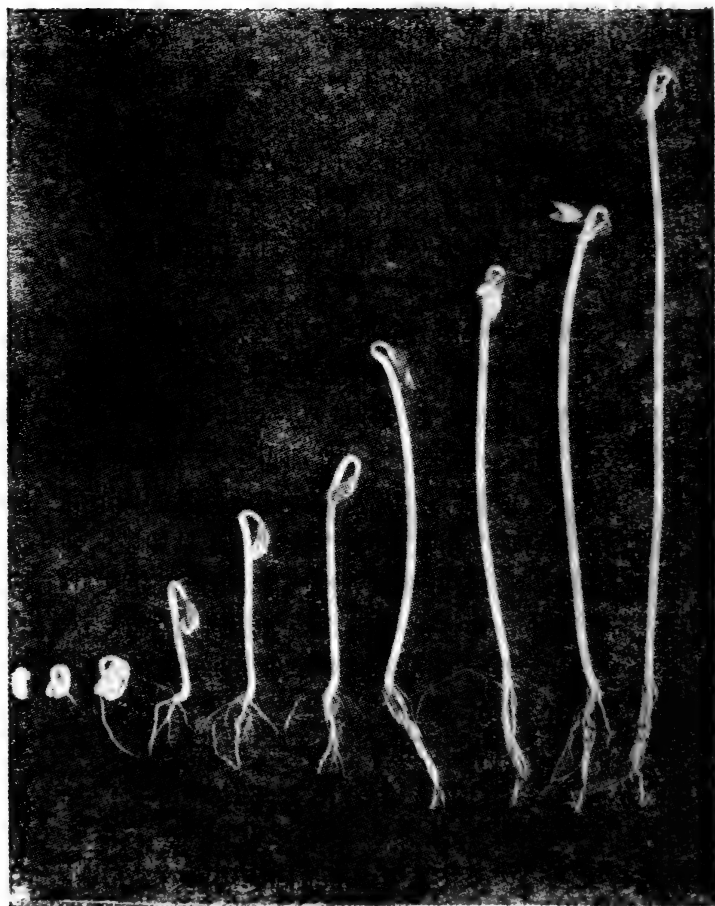
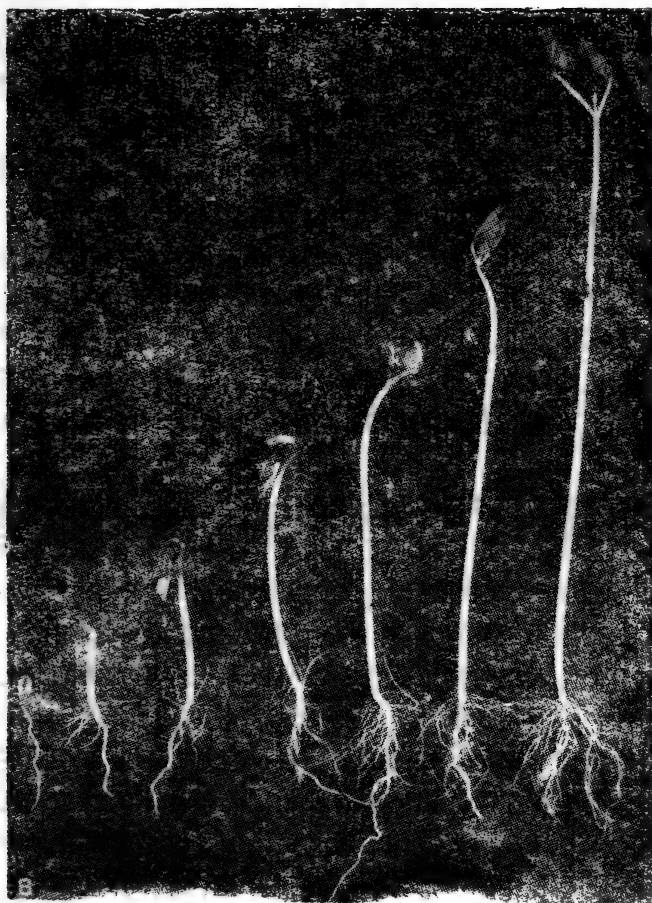


图 11-1 (A) 暗处生长 1 到 9 天的黑豆苗。注意观  
光照条件生长 3 到 9 天的黑豆幼苗。看到倒钩打开，  
以低强度红光连续照射( $630-700\text{nm}$ ,  $100\text{mWm}^{-2}$ ),  
灌溉。



察钩状器官和子叶与根之间茎（胚轴）的长度；(B)  
子叶和根之间胚轴长度抑制，以及叶片伸展。幼苗  
并培育在  $25^{\circ}\text{C}$  砂砾苗床上，用自来水通过底下管道

如菊花生长在完全加以控制的条件下，给以 8h 光照和 16h 的黑暗，它们将会开花。但如果在黑暗时期中间用很短的红光闪光(秒级)来中断黑暗，它们将不开花。

结种子的植物有一种能测量黑夜的长度和在适宜的季节开花结子的机制。在漫长的冬眠之后，种子在来年的春天气候条件适宜时萌发，所需要的适宜条件之一就是白天的长度。这种光周期反应在物种的延续上显然有很大用处。为了能在第一次致命的霜降之前结出种子，并允许光合作用积累最适量的贮备养分以维持幼苗自己在来年春天能通过光合作用制造自己的食物之前的生长，时间的测量必须是十分精确的。

在发现黑夜的长短是一个重要的因素和黑暗期被光中断能抑制开花的现象以后，了解对光信号有反应的色素系统的性质就有了可能。因此可以测定作用光谱(参阅 1.5.4. 和 3.7.)。

作用光谱是在不同波长上光量子产生一个反应的效率的度量。光化学第一定律说明要产生化学变化必须吸收光，因此，作用光谱与吸收物质(即色素)的吸收特性有关系。于是，如果红光产生反应最有效，那就一定有吸收红光的色素存在，这样的色素也可能是蓝色的，可以根据作用光谱的测定实验预计它的吸收光谱<sup>[3]</sup>。

植物生理学家早就知道的另一种反应是具有基本相同的遗传组分而生长在除光照环境外都相同的条件下的幼苗表现出不同的生长情况。大家都熟悉的一个例子就是储藏在黑暗地窖里的土豆长芽的情形，这些芽细长，呈白色，并且有小的叶子，这种苗称之为黄化苗。在见光地方发育的土豆芽则较短，呈绿色，并有肥大的叶片。

在暗处和见光条件生长的幼苗有类似的反应(图 11-1)。比较从第一次吸水时算起苗龄完全相同的幼苗，可看到若干



形态上的差别。最为显著的一个差别是胚轴长度(种子储藏养分的器官——子叶和根之间茎的部分)上的差别,胚轴长度受光的调节并对红光特别敏感。

在蚕豆苗开始破土而出的时候,茎形成一个倒钩以保护脆弱的生长尖端不受土壤颗粒的机械损伤(图 11-1)。这个脆弱的生长点包在子叶的中间,它被不断伸长的茎部拉出而不是推出泥土。在弯钩冒出地面见光以后,这个弯钩迅速地伸平,而使生长尖端处于植物的顶端;子叶张开,嫩叶迅速地增大、变绿、并开始进行光合作用。除光合作用之外,所有这些发育过程(包括去黄化、茎伸长、倒钩伸平、叶片增大和叶绿素合成)都是光形态建成反应。通过作用光谱的测量发现:红光对产生这些反应最有效。

如果覆盖休眠种子的土壤被犁过,露出来的种子就将因为曝光而萌发。假如种子不曝光,那就可以保持休眠状态很多年。1937 年测定的一个作用光谱(图 11-2)证明:所测量的红光量可使 50% 的种子萌发。但是,如果种子以不同波长

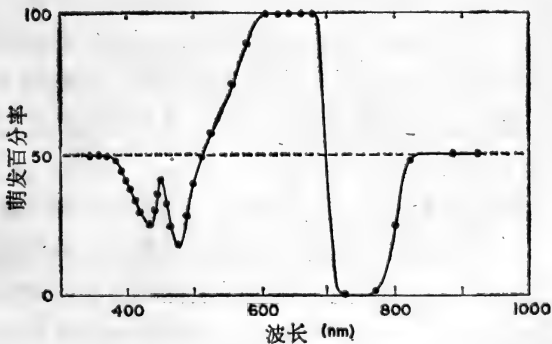


图 11-2 促进和抑制对光敏感的莠苣种子萌发的作用光谱。萌发百分率对波长作图。用实验前以恒定量的红光照射造成 50% 的萌发率作为对照,然后在标出的波长上进行照射,并测量促进或抑制发芽的效率(引自参考文献 5)。

的光照射,则蓝光和远红光抑制发芽,而红光可提高发芽的百分率。因此,在一定的条件下,光既能促进又能抑制种子的萌发。

### 11.2.1 光敏色素,一种光致变色分子

光对种子萌发的促进或抑制作用直到二十世纪五十年代才受到重视,当时提出这两个过程都受一个色素的控制<sup>[3]</sup>。这个假说在很多红光敏感的系统作了检验,并产生出一个这样的概念:所有红光形态建成反应都受具有某种未曾预料到的光致变色特性的一个单一色素的控制。光致变色色素是这样一种色素,在照光以后它的吸收特性发生变化,但再放回暗处时又会缓慢地恢复到原来的构型。在某些情况下,这种恢复原状的反转(暗反转)可以由于光照而加强(光反转)。例如,红光(660nm)照射把色素转化成促进生物反应的构型,这时它的吸收峰移到光谱的远红区(730nm)。如果该色素的吸收远红光的构型受到远红光照射,这色素就转变成不再起促进作用的构型,其吸收最大值又回到红光区。如果把该色素放回暗处,吸收远红光的构型便缓慢地变回到吸收红光的构型。这种色素实际上起着一个开关的作用,它能由于受红光或远红光照射而被打开或关闭,而且继续用红光或远红光照射可使这个过程重复多次。

一认识到光形态建成过程中涉及的只是一种光致变色的色素不久,几个实验室就开始为分离这种有活性的色素而进行了广泛的研究。但是,这种色素以很低的浓度(少于  $10^{-7} M$ )存在,在五十年代用通常的分光光度计通过直接测量吸收在活体内检测不出来。人们利用了这种色素在红光和远红光照射以后发生的光致变色的吸收位移这一特点,用一种灵敏的双波长分光光度计在 660nm (红光) 和 730nm (远红光) 处探

测到这种光可逆的吸收差值，这两个吸收差为鉴定色素的存在和存在的构型提供了一种灵敏和定量的物理测定方法。测量在 660nm 和 730nm 处吸收变化的这个技术为分离和提纯这种叫做光敏色素的色素开辟了道路。

已经有几家实验室分离和提纯了光敏色素<sup>[6]</sup>。这个色素是一种易溶于缓冲水溶液的蛋白质，它有一个开链四吡咯环作为发色团(吸收光的基团)。用普通的蛋白质化学技术可以使纯度提高许多倍，一般认为其分子量约为 120000 道尔顿，并能形成大约 250000 道尔顿的二聚体。高度纯化的这种色素的吸收光谱(见图 11-3)在照射红光或远红光后是光可逆的，它与大多数生理反应的作用光谱匹配得很好(见图 11-4)。这种色素分子的超结构还不清楚，以前得到的四聚体、六聚体或双亚铃形状的八聚体的电子显微镜照片现在经鉴定得知是在分离过程中随光敏色素一起带来的外源蛋白质<sup>[9]</sup>。从流体力学上看，光敏色素的行为像是一个轴比为 10:1<sup>[10]</sup> 的椭

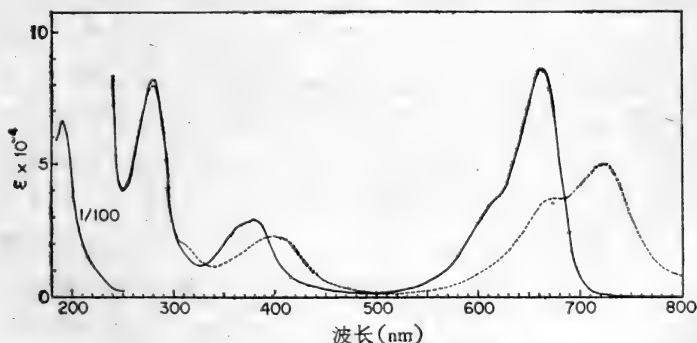


图 11-3 从暗外生长的燕麦苗提取的高纯度光敏色素的吸收光谱。 $P_r$  (光敏色素的吸收红光的构型) (—) 和  $P_{r_r}$  (光敏色素吸收远红光的构型) (-----) 的摩尔消光系数 ( $1\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 分别以实线和虚线表示。光谱是用 Cary15 型分光光度计在  $4.5^\circ\text{C}$  下用  $1.4 \times 10^{-5} M$  的水溶液 (按分子量 60000 计算) ( $\text{pH } 7.2$ ) 和 1 cm 光程测定的 (引自参考文献 7)。

圆体分子,有人认为它是一种糖蛋白,其重量的大约4%是碳水化合物<sup>[11]</sup>。

最有说服力的资料表明发色团结构是一个开链的四吡咯

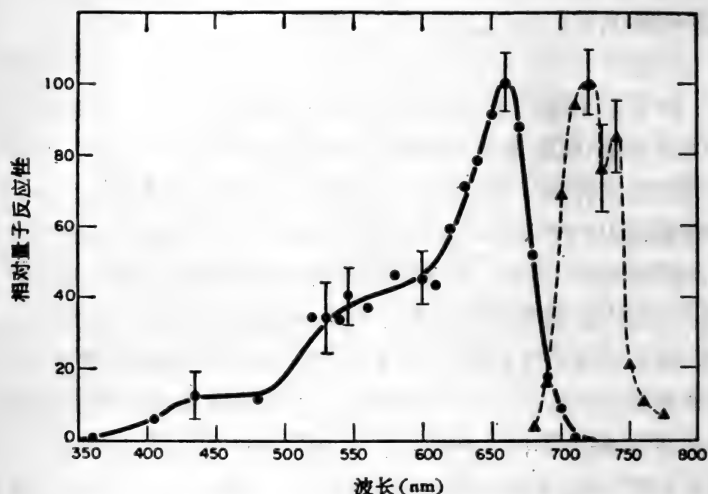


图 11-4 典型的受光敏色素调节的作用光谱;拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子萌发的光诱导和光钝化作用。图中实线代表诱导作用;虚线代表钝化作用。对于钝化曲线,种子在用单色远红光照射之前先用 660nm 的红光照射( $0.15 \text{ J m}^{-2}$ )。在那些曲率变化较大的点上标出了平均值的标准偏差(引自参考文献 8)。

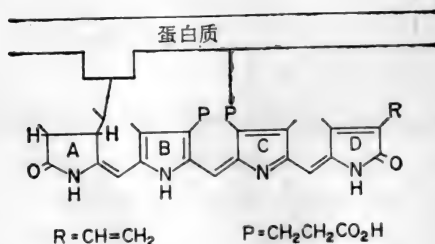


图 11-5 推测的光敏色素发色团的分子结构。 $P_r$  和  $P_{fr}$  对应的发色团有相同的环状结构,但是  $P_{fr}$  发色系统比  $P_r$  发色系统少一个 A、B 环之间次甲桥的双键(引自参考文献 12)。

环(见图 11-5), 然而, 每个蛋白上的发色团的数目、发色团和蛋白质之间化学连接的性质, 或吸收光量子以后分子内即刻发生的变化仍是不清楚的<sup>[13]</sup>。

## 11.2.2 光敏色素的反应

在分离提纯技术不断发展的同时, 用灵敏的双波长分光光度计<sup>[6]</sup>测定黑暗中生长的组织在两个波长上的吸收差值的方法, 人们更多地了解了活体中光敏色素的反应<sup>[14]</sup>。为了利用最大的光致变色位移, 通常选用 660nm 和 730nm 两个波长。然而, 由于在黑暗中生长的组织照射红光以后存在着叶绿素合成的问题, 因此经常只在 730nm 波长上进行测量, 并和红或远红作用光照射后没有任何吸收变化的 800nm 的稳定参考波长相比较, 用这种分光光度计可以很容易地在活体中观察该色素的光致变色性质, 并且可用式(11-1)的形式表示:



$P_r$  表示光敏色素的吸收红光的构型,  $P_{fr}$  表示它的吸收远红光的构型。当人们企图把活体测出的  $P_{fr}$  含量与一定量的红光照射所产生的生理反应联系起来时, 很快就认识到这种联系是不那么简单的, 终反应除受  $P_{fr}$  浓度的影响外, 还受其它因素的影响。

第一个复杂之处是这两种构型色素的吸收在某些光谱区域严重地重叠, 并且不可能通过照射使色素从一种吸收构型完全变成另一种吸收构型。这一事实从图 11-3 中给出的吸收光谱看得很清楚, 通常用 660nm 红光照射时得到的是两种吸收的混合物。这种光平衡的定量数值可由方程式(11-2)计算得到:

$$\frac{[P_{fr}]_{\infty}}{[P_r]_{\infty}} = \frac{I_{\lambda} \epsilon_{r\lambda} \Phi_r}{I_{\lambda} \epsilon_{fr\lambda} \Phi_{fr}} = \frac{\epsilon_{r\lambda} \Phi_r}{\epsilon_{fr\lambda} \Phi_{fr}} \quad (11-2)$$

比值  $[P_{fr}]_{\infty}/[P_{tot}]$  接近于 0.80, 这里  $[P_{tot}] = [P_r] + [P_{fr}]$ ,  $[P_r]_{\infty}$ ,  $[P_{fr}]_{\infty}$  = 光平衡时两种吸收构型的浓度,  $I_{\lambda}$  = 在波长  $\lambda$  处的照度;  $\epsilon_{r\lambda}$ ,  $\epsilon_{fr\lambda}$  = 波长  $\lambda$  处吸收红光和吸收远红光的构型的摩尔消光系数;  $\Phi_r$ ,  $\Phi_{fr}$  = 吸收红光和吸收远红光的构型的量子产额。

于是, 在 660nm 光照下产生两种构型之间的光平衡使得约 80% 的色素以  $P_{fr}$  构型存在。对受到 730nm 光的光照来说, 只有约 3% 的色素处于  $P_{fr}$  构型。在以后讨论高辐照度的反应和天然环境中白光条件下这种色素的状态时将会看到这些比值的重要性。

第二点复杂之处是照光以后出现的比较缓慢的暗反应。如果在短暂的红光照射以后测定光可逆的光敏色素的总量  $[P_{tot}]$  随时间的变化, 发现可逆的色素总量迅速下降(见图 11-6)。这过程就是所谓的暗破坏, 因为这过程依赖温度, 并且对诸如叠氮钠或氰化钠之类的代谢抑制剂敏感, 所以  $P_{fr}$  看来被酶促转变成一种不再能光逆转的钝化构型。但是, 生理上的反应看来确实与短暂(少于 5 min)照射红光最初产生的  $P_{fr}$  水平有定量的关系。

另一个出现的过程是暗逆转, 在这个过程中新形成的  $P_{fr}$  在暗处自发地转变成  $P_r$ 。在某些组织中很难看到这个过程, 并且由于在红光建立的初始光平衡中  $P_{fr}$  和  $P_r$  分别为 80% 和 20%, 使这过程复杂化了。当发生暗破坏时, 可逆色素的总量减少,  $P_r$  的百分比似乎作为时间的函数而增加, 这只是因为  $P_{fr}$  含量降低时, 原来得到的 20% 的  $P_r$  只要不再受红光照射就不会消失。例如, 1h 以后, 第二次照射红光将建立一个 80% 的  $P_{fr}$  和 20% 的  $P_r$  的同样的光平衡, 但是由于到这时

为止全部的  $P_{fr}$  的多一半已经破坏，于是一部分  $P_r$  被转变成  $P_{fr}$ 。可能会不正确地解释这些结果而认为是合成了  $P_r$ ，而事实上，即使有合成的话，合成速度也是非常低的（见图 11-6）。

$P_{fr}$  可以以质子化的形式  $P_{fr}H$  存在<sup>[16]</sup>，它能转换成  $P_r$ 。当然， $P_r$  也可以再由前体合成。在活体内可逆的光敏色素的增加可以用分光光度法测量。光敏色素随时间的增加与暗处生长的幼苗鲜重的增加大致上平行，但是，光可逆的（植物）光敏

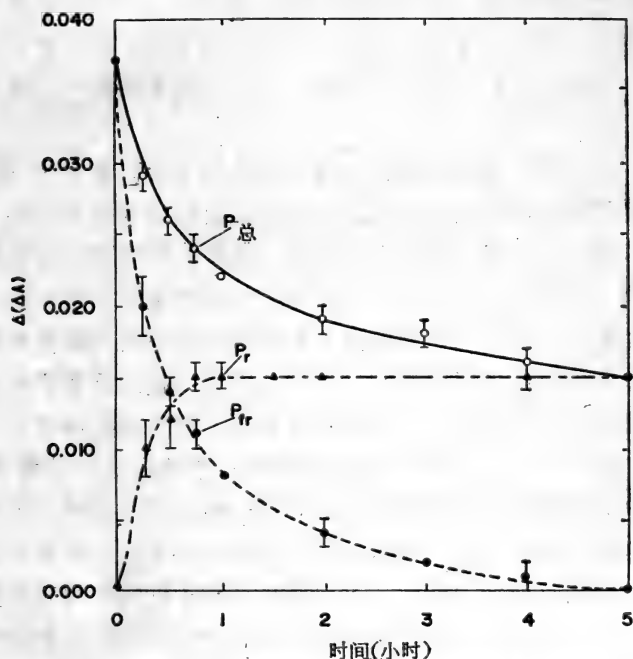


图 11-6 暗破坏。蚕豆幼苗在 660nm 红光的短时间饱和光照以后 ( $1KJm^{-2}$ )，分光光度计上可以检测到的（植物）光敏色素的含量在黑暗中随时间的变化。新形成的  $P_{fr}$  迅速消失。（○）代表测量可逆的（植物）光敏色素的总含量所得到的值；（▲）代表用 660nm 红光第二次照射以后吸收率的生长；（●）代表直接测量的  $P_{fr}$  的数值。在所有情况下都是以 800nm 为参考波长测量的吸收率差值。误差线段代表 20 次重复测量平均值的标准偏差（引自参考文献 15）。

色素的这种增长可能不完全是由于合成。例如,当种子吸水并开始萌发的时候,光可逆的光敏色素的水平提高了。所有这一切可能是光敏色素分子微环境变化的结果,这种微环境的改变使光转换成为可能。虽然组织中的其他蛋白都能标记,但是将放射性氨基酸参入由种子或切下来的胚芽长成的裸麦幼苗中可提取的光敏色素中去的企图却未能成功<sup>[14]</sup>。因此说明几乎所有存在于幼苗中的光敏色素都早已存在于干种子或胚芽里。显然,光敏色素的合成一定是发生在照光生长的植物中,但是,人们几乎完全不知道合成的速率和在什么地方进行合成。

已经在培养的胡萝卜细胞中观察到光敏色素的合成<sup>[14]</sup>。光敏色素总量的增加与形成的细胞数目的增加是平行的。胡萝卜细胞培养系统的一个问题是:在最初取自同一母体的不同的二倍体细胞灶中所产生的光敏色素的水平相差一倍。虽然如此,在理论上这种组织培养的方法对观察光敏色素的合成速率仍提供了很多便利。人们特别感兴趣的是要了解光敏色素的蛋白部分和发色团相比是否有不同的转换速率。

图 11-7 是概括所有这些过程的一个总图式。尽管黑暗中  $P_r$  转换成  $P_{fr}$  在热力学上很不可能,但在莴苣属种子中看到了这种转换。可是,在体外或幼苗中却从来没有观察到这种反过来的暗逆转。因此,这可能是和种子抑制作用有关的一种假象,所看到的可能是光敏色素的一种中间构型  $P\ 650$ <sup>[17]</sup>。 $P\ 650$  (在脱水的极端分子环境中形成的)在暗处可以转换成  $P_{fr}$ ,因而可以解释在远红光照射以后从外表上看到的由  $P_r$  到  $P_{fr}$  的合成。

### 11.2.3 作用的原初位置

虽然这不是所有研究者一致的意见,但一般都认为  $P_{fr}$  形



式是光敏色素的有生理活性的形式。这主要根据以下两个事实：①在暗处生长的幼苗中光敏色素的主要形式是  $P_r$ 。如果幼苗继续留在黑暗中，则大部分发育过程(例如去黄化过程)不会发生，除非在很长时间(几天或几周)以后，故推测  $P_{fr}$  是引起反应的活性部分；②在暗处生长的幼苗里的  $P_r$  是比较稳定的，而  $P_{fr}$  一经形成就开始从组织中消失，这可能是它被用于触发发育过程的缘故。不难设想， $P_r$  是发育过程的抑制剂，一旦把它去除，反应就可以发生，但只有了解  $P_{fr}$  作用的精确的分子模型以后，这个问题才能最终得到解决。

在图 11-7 给的总图式中指出： $P_{fr}$  和某些反应物 X 相结合，然后产生可观察的生理反应。X 的性质尚不清楚，但它可能与  $P_{fr}$  分子效应的放大有关。虽然效应被放大了，但反应的大小通常与产生  $P_{fr}$  的量成比例，并且遵从反比定律，也就是

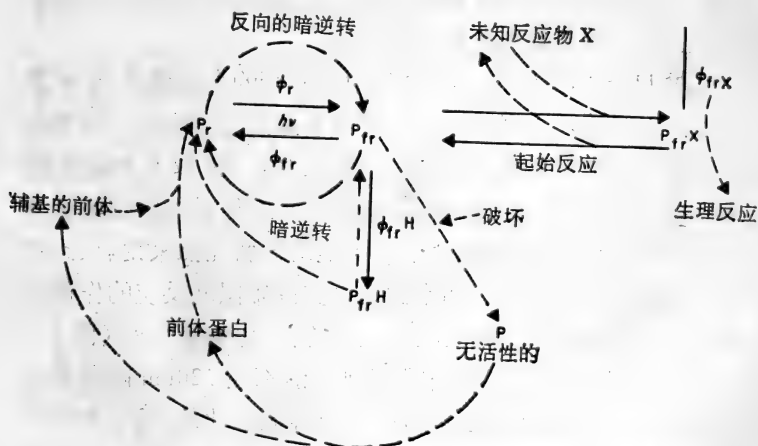


图 11-7 假定的光敏色素的各种构型之间的关系， $P_r$  是吸收红光的构型， $P_{fr}$  是吸收远红光的构型，实箭头表示光转化， $\phi_r$  和  $\phi_{fr}$  分别是红光和远红光构型的量子效率。虚线表示暗反应， $P_{fr}$  和未知的反应物 X 结合引起生理反应。 $P_{fr}H$  是正文中讨论过的质子化形式(引自参考文献 14)。

说,如果调节辐照度和时间这两个变量使它们的乘积为一个常数,那么在相当宽的辐照度和照光时间范围内所产生的反应是相同的。显然,如果辐照度极低,而且所需的照光时间与观察生理反应所需的时间是同一个数量级,那么反比关系就不成立了。

#### 11.2.4 高辐照度反应系统

在光敏色素研究的早期就认识到:对连续照射特别是高辐照度的连续照射<sup>[18]</sup>所产生的反应来说,反应的大小不是简单地与原先存在的  $P_{fr}$  的含量成正比,而是与整个期间保持的  $P_{fr}$  水平和辐照度值两者成正比例。这些反应是与辐照度有关的,即不遵从反比定律,并且往往难以证明它们是光可逆的。然而,在正确的实验条件下对短暂的光照而言,往往能够表明这些反应是能被红光和远红光完全加以光逆转的,因此证明这些反应是受光敏色素调节的。

图 11-8 中所给出的芥菜苗中花青苷的合成就是这种系统的一个例子。当用连续的红光或者远红光照射时,这种红的色素产物的积累明显地依赖于辐照度。在 12 h 的照射时间内,远红光使  $P_{fr}$  保持近似恒定的水平,但是如果辐照度增加 1000 倍,则反应提高 4 倍。可是对短暂光照来说,反比定律还是能够成立的<sup>[19]</sup>。如果测定这类高辐照度反应的作用光谱,它们既不符合  $P_r$  的吸收谱也不符合  $P_{fr}$  的吸收谱(图 11-9;参看图 11-3)。这些作用光谱一般都在 720nm 附近有一个最大值,在光谱的蓝区有多个吸收峰值。此外,两个单独使用效果不大的波长(即 658nm 和 766nm)合在一起同时照射却很有效,在效应上它们是协同的。如果一个有效的波长比如 717nm 和 658nm 混合照射,则 717nm 的效率大大地降低,这表明存在颉颃作用<sup>[20]</sup>。

从这类资料中产生了一个循环过程的概念，它认为系统似乎在“计数” $P_r$  和  $P_{fr}$  构型之间分子循环的次数。对于任意两个或多个波长混合照射来说，如果假定暗反应的速率常数比图 11-7 中标示的光反应的速度常数小得多，那么一旦达到光平衡， $P_r/P_{fr}$  的相对比例就保持恒定。辐照度越大，这两种构型之间的相互转化就越快，尽管这时平衡值可能保持相同。如果反应与相互转化的速度成比例而不是简单地和  $P_{fr}$  分子的浓度成比例，那么反应的大小将依赖于辐照度。这也可以用来解释两个波长混合照射时观察到的协同效应，因为两个单独使用效果不大的波长(658 和 766nm)同时照射提高了相

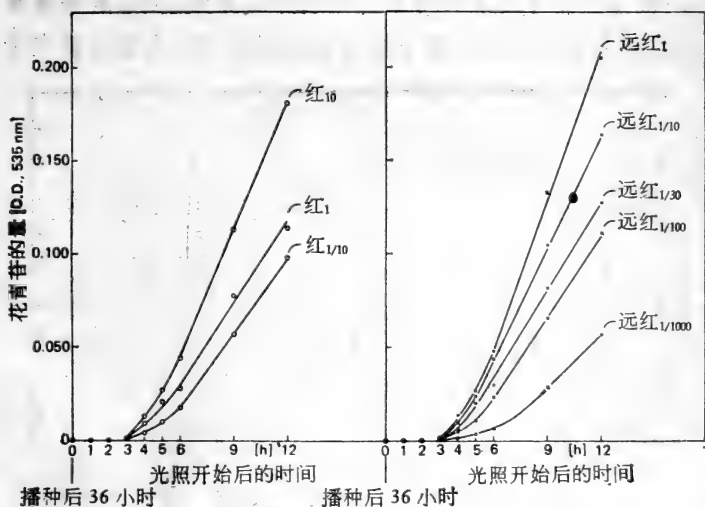


图 11-8 高辐照度反应。芥菜苗在红光 ( $675\text{mWm}^{-2}$ )或远红光( $3.5\text{Wm}^{-2}$ )连续照射下，花青苷随时间的积累与辐照度的关系。这两个辐照度用脚注 1 表示，而其它脚注表示这两个辐照度的倍数。芥菜苗在暗处生长 36 h，然后以标明的辐照度连续照射。对于远红光来说， $P_{fr}$  的水平在 12 h 内基本保持不变，因此很清楚，花青苷积累的量是辐照度的函数。对于短暂的 ( $<5\text{ min}$ ) 红光或远红光照射，反应遵从反比定律并且是完全光可逆的。

互转换的速度。

最近,有人用连续远红光照射下全部光敏色素的稳态水平来解释这些高辐照度反应<sup>[21, 22]</sup>。如果从数学上建立一个表明这些过程相互关系的模型来分析光敏色素发生的所有光过程和暗过程(包括推测的中间构型),(见图 11-7),那么全部光敏色素的平衡值是与辐照度有关的。人们发现  $P_{fr}$  的稳态水平反比于远红光的辐照度。如果用这一同样的数学描述<sup>[21, 22]</sup>,并以已知或估算的数值代入每一过程的速率常数,就可得到一些与若干实验测定的作用光谱一致的理论作用光谱。但需要做如下的假定:①存在一个阈值,低于此阈值光敏色素将不再衰变;②从一种生物系统变到另一种生物系统,反应的速率常数只是稍有改变。这个数学描述之所以非常引人注目就在于

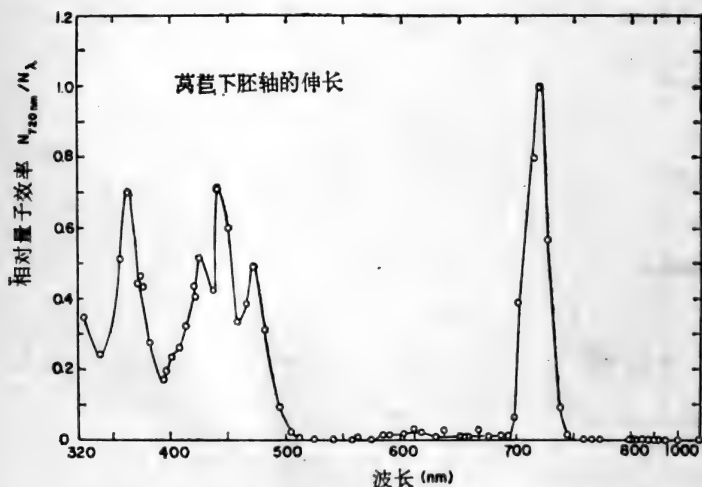


图 11-9 抑制莠苣下胚轴生长的高辐照度作用光谱。每一波长的相对量子效率都以 720nm 的量子效率为基准。速生莠苣苗在播种后 54 和 72 小时之间连续地照光,并测量这期间下胚轴长度的增长。在 25℃ 时,对 720nm 处辐照度为  $145 \times 10^{-12} \text{ mol 光子 cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  的情形观察到下胚轴长度比暗处生长的对照苗增长 50% (引自参考文献 20)。

它能对作用光谱最大值很不相同的各种各样的反应定量地预计观察的结果。然而，这个数学模型的普遍适用性尚待进一步的实验验证。

### 11.2.5 异化基因的激活

数学模型和  $P_{fr}$  的浓度计算不能解决在分子水平上  $P_{fr}$  分子对于产生生理反应起了什么作用的问题。换言之， $P_{fr}$  与之反应的化合物 X 是什么？人们提出了两个互不排斥的一般机

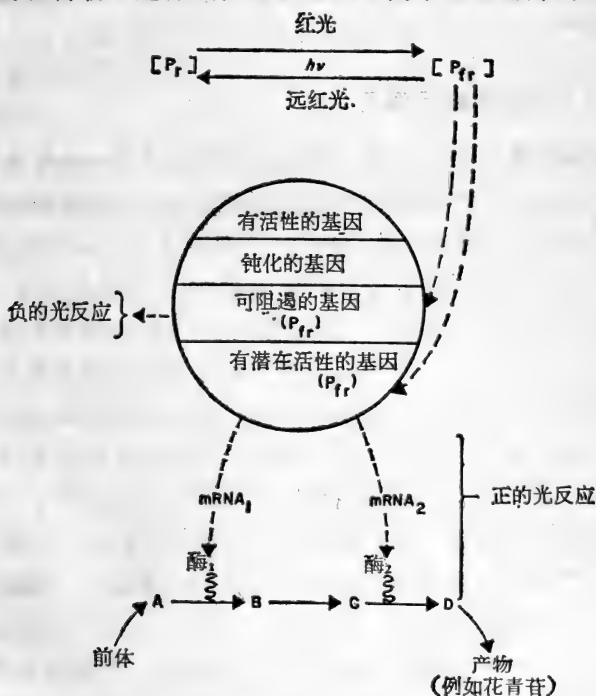


图 11-10 对光敏色素所调节的反应提出的说明由  $P_{fr}$  控制的异化基因的激活和异化基因的抑制的假说的框图。圆圈里面代表植物的基因组。当光照产生有活性的  $P_{fr}$  时，它或者能够抑制一些基因而停止一些酶的产生(负的光反应)，或者能够诱发酶的全程生物合成(正的光反应)(引自参考文献 14)。

制。一种机制认为光敏色素作用的主要方式是引起异化基因的激活(图 11-10)。当  $P_{fr}$  产生时,它特异性地影响有潜在活性的和可阻遏的基因,结果伴随着那些调节产物生成的酶的产生或抑制。支持这种异化基因激活机制的最明显的例子是  $P_{fr}$  对诱发苯丙氨酸解氨酶和抑制脂氧合酶的控制。受  $P_{fr}$  水平控制的 35 个酶系和不受  $P_{fr}$  影响的 8 个酶系已经制成表(参阅参考文献 3, 488 页)。然而,用重水  $^2H_2O$  密度标记的数据指出:光敏色素可能不是在所有情况下都直接控制酶的全程合成<sup>[23]</sup>。

### 11.2.6 和膜的相互作用

光敏色素系统调节的一些反应可以在几分钟内迅速发生,这表明光敏色素是通过改变膜的通透性在细胞膜水平上进行控制的。这种效应最明显的一个例子是 Tanada (棚田) 效应<sup>[14]</sup>。如果切下大麦或绿豆的根尖,再以红光进行照射,则在根尖表面产生正电荷。当把根尖放在一个其玻璃表面已预先用磷酸根离子处理过的烧杯里的液体介质中,根尖就会吸在带负电的玻璃表面上。如果这时再用远红光照射根尖,根尖就不再吸在壁上。这种红光,远红光的光可逆性是光敏色素控制的反应的标志。由光引起的禾草幼苗的胚芽鞘生物电位的变化直接测量表明,膜的这些电位的变化是受光敏色素控制的<sup>[24]</sup>。在蚕豆幼苗不同器官间光敏色素调节信号的迅速传递也与膜有关<sup>[25]</sup>。

与颗粒状细胞物质结合的光敏色素的分离工作已成功<sup>[26]</sup>,目前正在广泛探讨这种假定的光敏色素-膜系统的特征。红光照射后,从南瓜幼苗中提取的光敏色素中的 40% 作为结合的  $P_{fr}$  呈颗粒状沉淀,如果红光照射以后跟着再用远红光照射,便只有 4% 的光敏色素是颗粒状沉淀的,  $P_{fr}$  似乎是有

选择地结合到微粒状物质上。此外,由于它逐渐失去光可逆性,结合的  $P_{fr}$  则被破坏。如果在提取以前插进 2 小时的黑暗期,发现光敏色素很少处于结合状态。因此,得出结论:当光敏色素结合到膜上时,  $P_{fr}$  便遭到破坏。但是有一点是清楚的,即颗粒状沉淀的光敏色素的存在不能证明色素是与膜结合的<sup>[27]</sup>。

已经从纯化的光敏色素制备出特殊的免疫着色剂。这个方法已被用于光敏色素在细胞内的定位,定位数据证明在红光照射后光敏色素位于与膜结合的部分。红光照射之前光敏色素是均匀分布的,但在变成  $P_{fr}$  构型后则迁移到特异的受体位置<sup>[28]</sup>。

这些数据与对暗处生长的幼苗中叶绿素积累而言的光注量-生理反应曲线的变化是一致的。也和以任何一种光预先照射后的幼苗敏感性的改变一致<sup>[29]</sup>。如果幼苗已用红光照射过,或者先用红光再用远红光照射过,或者只用远红光照射过,则光注量-反应曲线沿能量轴发生位移,使得为产生叶绿素的积累现在就需要较大的照光量。但是,光注量-反应曲线的斜率较大,因此吸收的光量子看来更加有效。

现在有一种假说,它认为  $P_r$  分子近乎均匀地分布在整个细胞中,而任何光照以后,  $P_{fr}$  分子集中在膜上的活性部位。由于光敏色素集中在膜上而使接受入射光能的色素吸收体的面积缩小,因此捕获入射光量子的机率减小了。然而,一旦量子被吸收,它对于刺激光形态建成反应就更为有效。在单独用远红光照射或者先用红光再用远红光照射这样的光逆转循环以后,剩下的  $P_{fr}$  的总量很少,但是它结合到膜上并影响以后的光注量-反应曲线。也许这就解释了光敏色素分子吸收的任何光照都可以产生去黄化的现象。无论建立什么样的  $[P_{fr}]/[P_r]$  的光稳态,都有一些  $P_{fr}$  变成与膜结合的,这种结合

的物质能改变系统以后的光敏感性。

## 11.3 蓝光反应

第二类光形态建成反应是那些习惯上叫做蓝光调节的反应。这类光形态建成反应是大量存在的，从作用光谱数据来看，它们似乎有一个共同的光受体。光运动(参阅第12章)、真菌的光诱导生长反应、原生质的流动、细胞质粘度的改变，以及能改变生长和分化的很多反应都属这一类反应<sup>[30,31]</sup>。

### 11.3.1 光诱导的类胡萝卜素的合成

一个典型的蓝光反应系统是在真菌脉孢菌(*Neurospora*)菌

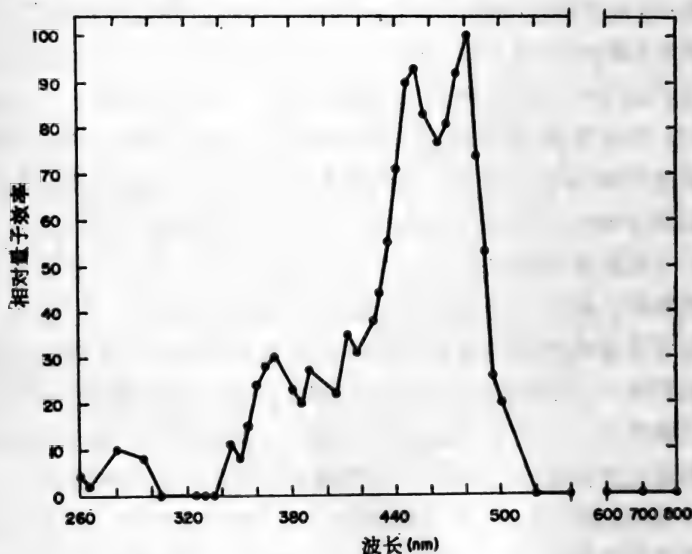


图 11-11 在真菌脉孢菌的菌丝中光诱导类胡萝卜素的生物合成的作用光谱，这是一种蓝光的光形态建成反应(引自参考文献 32)。



丝体中诱导的类胡萝卜素的合成。对这种系统来说,几乎绝对需要的是光照,在黑暗中只有微量的类胡萝卜素在合成。假若暗处生长的菌丝受到短暂的、光子总数不高的光照,然后在6℃保持48小时,则有大量类胡萝卜素被合成出来。有黄色的、橙黄色的和红色的类胡萝卜素,但主要的一种是脉孢菌黄质(neurospoxanthin),它是一种橙红色的35-C酸性类胡萝卜素。在图11-11上给出了一个详细的作用光谱,它是这种蓝光反应的一个典型。在400—500nm区域中有多个吸收峰。520nm以上没有任何活力,但在近紫外区有活力。在这些反应中近紫外辐射的效率是可变的,因此引起很多有关光受体本质的争论。某些蓝光反应作用光谱在365nm附近有一个明显的峰值,这证明是黄素类型的光受体。其它一些作用光谱在365nm处只有一个小峰,从而证明是类胡萝卜素的光受体<sup>[31]</sup>。

### 11.3.2 光受体的性质

大多数令人信服的资料认为有一种黄素型光受体,但仍存在争论<sup>[33]</sup>。当然,最有力的证明是分离光受体体系,并在体外观察受体执行功能的情况。

活体透射率的测量表明蓝光照射后脉孢菌和粘菌(*Dictyostelium*)的吸收发生位移,提取的物质<sup>[34,35]</sup>也表明有同样的吸收变化,并且已经证明黄素对细胞色素的减少起着调节作用。但是,这个体系是否就是对蓝光光形态建成反应负责的生理上有关的体系尚不清楚。在支持黄素光受体的观点方面,人们已经能直接光激发光受体的最低三线态<sup>[36]</sup>。利用可调频的激光进行刺激,对于须霉属(*Phycomyces*)的芽孢囊的向光反应和光生长反应两者观察到的作用光谱的最大值都在595nm,595nm处的最大值高度是455nm处的最大值高度的 $10^{-9}$ ,这

和计算出来的核黄素在这个光谱区的吸收截面是一致的。

虽然蓝光反应似乎是受一个共同的光受体系统的调节,但可能不是对所有情况都是如此。光反应系统的进化多半有多种途径,并且恰好发生在若干结合点上。例如,在脉孢菌和头孢菌(*Cephalosporium diospyri*)属中,类胡萝卜素的光诱导只对小于 520nm 的波长才出现<sup>[32,37]</sup>,某些细菌和分枝杆菌属也对红光反应,它们的光受体被认为是一种卟啉<sup>[38]</sup>。此外,在高等植物中类胡萝卜素的合成可能受光敏色素系统的调节<sup>[1]</sup>。

#### 11.4 藻类的光形态建成

在藻类中还有其它的光形态建成反应,其中之一是色适应<sup>[39]</sup>。根据藻类生长的环境中光能的波长分布,这些反应可以改变藻类的色素组成,色素组成的这些改变通常是由于合成的相对速率以及胆蛋白色素、藻青蛋白、藻红蛋白和别藻蓝蛋白总量的不同引起的。

胆蛋白作为整体起着辅助色素的作用,它把吸收的光量子传递给有光合作用活性的部位,因此,如果藻类生活在能引起光合作用的光很弱的区域,就会产生色适应,并且将合成出在这个光谱区有强烈吸收的色素。具有色适应的机体能够获得大部分能利用的能量,因而生存能力强。

伴随着亚细胞水平上色素组成的变化,还出现宏观的光形态建成反应。例如对丝状蓝绿藻(*Fremyella diplosiphon*)<sup>[40]</sup>所描述的那些反应。当藻丝体在白光荧光灯下生长时,平均长度是 460 $\mu\text{m}$ ,每个藻丝体平均有 40—60 个细胞。如果藻丝体生长在红光下,平均丝长度是 50 $\mu\text{m}$ ,只由 10—15 个细胞组成,不同波长的光对形态的这些影响在用光继续处理后

是完全可逆的(见图 11-12)。

这些反应的作用光谱(图 11-13)表明绿光刺激产生长的藻丝体(无序生长),红光产生具有短藻丝的培养物。寻找与作用光谱中那些最大值匹配的色素的工作没有取得成功。大多数作者认为别藻蓝蛋白是与红光区最大值对应的受体,但是绿光区的最大值说明存在着一种色素的聚集体。通过与光敏色素类比,还提出了有一个光可逆的色素体系的想法。但是至今还没有分离出具有活性的光受体。对于吸收最大值在

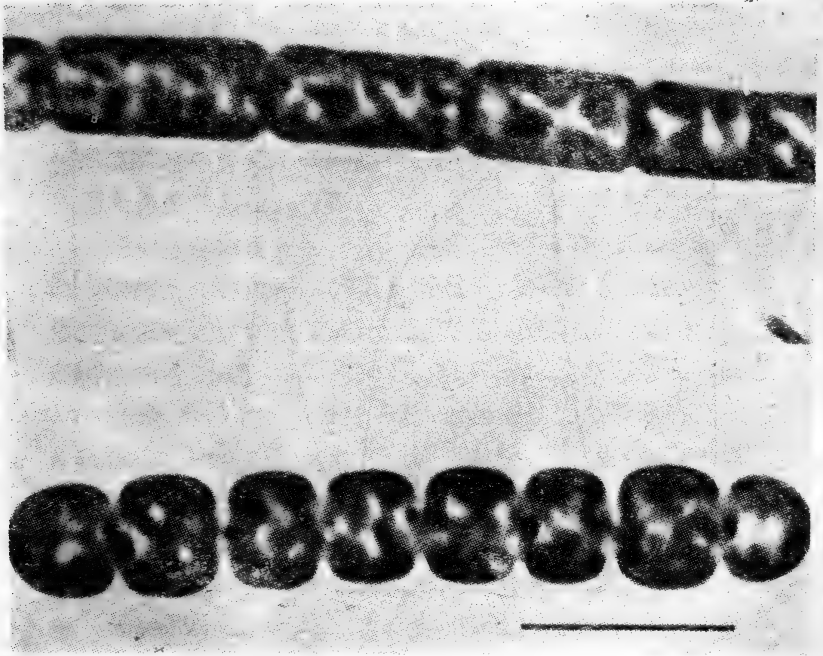


图 11-12 对荧光辐射(图上方)和红光照射(图下方)适应了丝状蓝绿藻藻丝体之间形态学的差别。荧光照射(250 英尺烛光)培养的藻丝平均长约  $460\mu\text{m}$ , 45—60 个细胞。红光照射( $\sim 0.1 \text{ W m}^{-2}$ )的藻丝平均长度  $50\mu\text{m}$ , 含 10—15 个细胞。这些光诱导的变化是完全光可逆的。

图中所画线段的长度是  $10\mu\text{m} \times 1950$  (引自参考文献 40)。

蓝绿色和黄色光谱区的其它藻类，类似的可逆色素已有报道<sup>[41]</sup>。

从进化的观点看，人们认为藻胆蛋白有双重作用<sup>[39]</sup>，它们不仅在不利条件下作为辅助色素帮助进行光合作用，而且相似的或者完全相同的色素还同时控制着代谢过程。完全有理由认为藻丝体长度的抑制和生长过程是在胆蛋白控制之下进行的，并且与高等植物的光敏色素的情况一样，只是在进化过程的后期才出现单一的光致变色的胆蛋白。

还有一点很有趣，这种色适应的反应可以和光环境中自

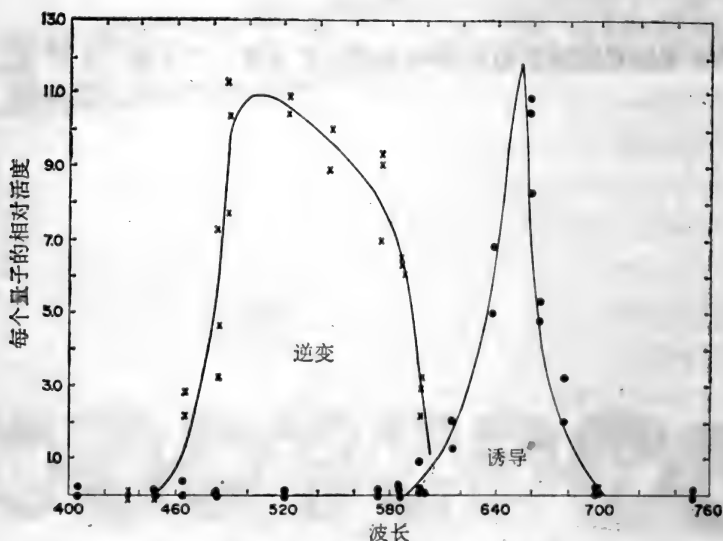


图11-13 从无序生长培养的蓝绿藻灰色念珠藻 *A* (*Nostoc muscorum A*) 形成藻丝体的光诱导和光逆变的作用光谱。在琼脂上发育成无序生长微克隆的暗处生长的细胞(年龄 14—18 天)，用每一波长上的注量都是  $150 \text{ Jm}^{-2}$  的光加以诱导，为了逆变，对这些细胞进行饱和的红光照射，然后在每一波长上接受注量为  $288 \text{ Jm}^{-2}$  的照射，记录在暗处 4 天以后发育成的藻丝体(引自参考文献 39)。

然的周期性波动相配合,起着自身调节的形态建成功能。在水生环境中,太阳光的红光部分比蓝光或绿光随着水的深度更快地减弱。此外,浮游植物本身起着光谱滤光片的作用,随着溶在水中的养分的增加和浮游植物数量的增加,在浅水区光谱的绿色成分相对增加。在深水区和红光比重增加的情况下,念珠藻在发育上表现出延迟形成藻丝的特点,因此,当念珠藻数量增加时,无序生长阶段的出现是和绿光的透进相对应的,这样生长周期就变成同步了,并且可能是调节浮游生物蓝绿藻开花的途径<sup>[39]</sup>。

形态学上的这些变化(多形态化)受到照射机体的光的光谱分布的调节。形态学上受环境的控制,这种形态上的变化给分类学家根据形态和结构进行分类带来了许多麻烦,许多这类藻类被分类为不同的品种,而实际上它们却只不过是同一品种的多形态化的变形。

光形态建成反应另一个一般原理是它们往往不是那些绝对地依赖于光的过程。在很多情况下,发育过程已经完成,然后光敏感的光受体改变成环境感受器。例如,在念珠藻里,藻红蛋白的合成速度受光的调节,如果念珠藻在完全黑暗的条件下培养,当加进一个外部能源时,几周后仍然会最终合成出藻红蛋白。高等植物的开花过程有类似的情况,如果豌豆或马铃薯在完全黑暗条件下放置6周或更长的时间,也会开出许多花来。在美洲 Wonder 豌豆无论开花和结果都是在完全黑暗中进行<sup>[42]</sup>。大多数光敏感的种子如果在黑暗中保存足够长的时间或用其它物理方法刺激(例如剥掉种皮或用渗透分离)也将在黑暗中发芽。结论是:在光形态建成反应中光似乎起纯粹的调节作用,而启动光形态建成反应并不绝对需要光。

## 11.5 光形态建成的重要性

我们所描述的大多数反应其分子机制已在实验室里完全确定和控制的条件下得到阐明。由于和环境相互作用的复杂性,这样做是唯一合理的途径,但是我们现在正处于这样一种知识状况:我们相信在实验室成立的事情实际上反映了自然环境中所发生的情况。

至今还没有任何人能测定在自然条件下生长的绿色植物材料中的 $[P_t]/[P_r]$ 比值。事实上,还没有任何人从完全是绿色的植物中成功地分离出(植物)光敏色素,但是,由观察到的反应我们有理由相信光敏色素确实存在。例如,植物生理学家早就观察到所谓阳面生长的植物和阴面生长的植物之间在叶片大小和形状上的差别,阴面生长的植物叶片通常比在开阔地生长的同种植物叶片面积大,而阳面生长的植物叶片比较厚,并且靠近茎中间部分的叶子有最大的趋势<sup>[43]</sup>。

关于叶片的大小和形状受光控制的问题在文献中亦很混乱,这是由几个因素引起的<sup>[44]</sup>: ①不仅辐照度是重要的;②叶片表面辐照度的光谱品质也是重要的,像在 11.4 中所描述的念珠藻体系那样,高等植物叶子是极好的远红透射滤光片,若测量穿过叶冠的光的光谱品质随距植物顶端距离的变化,发现光谱的远红部分增加。植物顶部的叶子可能是处在红光丰富的环境中,而植物中部的叶子则可能是在远红光丰富的环境中,因此,茎的伸长和叶片的增大必然受到天然背阴的强烈影响;③在实验室条件下,植物根部的矿物质和水的比例对所观察到的发育影响很大。在白杨树叶子中光合作用能力不仅是光强度的函数,而且也与水和离子之间的平衡有关<sup>[44]</sup>。

有许多因素在起作用,而一直被人们忽略的那些因素是

植物生长的微环境中光谱品质的难以捉摸的变化,关于这个参数和它的影响我们知道的太少。再举一例,许多文献讨论了阳面植物和阴面植物的补偿点(刚好能平衡植物对能量的需求时所需的光强度的数值)<sup>[45]</sup>,虽然与这些补偿值对应的辐照度变化可达 10 倍,但却很少考虑到光环境的光谱品质。在确定这些补偿值时可能会涉及起调节作用的光形态建成的过程。

新品种在某些地理区域的蔓延和植物的竞争都是一些复杂的问题。借助绿荫下远红光环境增强的办法可以在很大程度上防止杂草种子的萌发<sup>[46]</sup>。一株植物所给种子的发芽灵敏度受其亲本植物在种子成熟之前所接受的光的光谱品质的调节,这现象至少在实验室能证明<sup>[47]</sup>。但是,在自然界中这种过程的生存价值还不清楚。

### 11.5.1 光谱品质在自然环境中的重要性

对环境中光谱品质的重要性了解得还很少,由于实验上的困难和花费大,往往都是根据一些太阳和天空的理论模型进行计算,而不是实地测量光谱品质。模型计算<sup>[4]</sup>表明:红光与远红光的比值变化不大,但是测量日出和日落后直接的太阳辐射<sup>[47]</sup>以及总的太阳和天空光的宽带光谱指出:这个比值不是没有变化(见图 11-14)。

总天空光(包括直射光、散射光和反射光)是很重要的,因为照射到象叶片这样一个伸展的接收器上的不只是直接的太阳光,而正是这样的天空光。在测量到达地球表面的波长最短的紫外辐射时,可以看出总天空光的重要性。如果测量太阳辐射时准直管的方向放成使得只有太阳圆球和紧靠它的边缘区域被测量到,则短波的下限在 290nm 左右。但是,如果在同样的测量仪器上放上一个石英漫散射器,使测到的光来

自整个半球空间(包括太阳辐射和天空辐射两部分),则记录到 285nm 的辐射。这个结果符合于这样一个假说: 285nm 的辐射明显地是由太阳的直射光散射出来的,而它通过多次散射和反射成为天空光的重要成分<sup>[49]</sup>。为了探究生物体系可能对光刺激做怎样的反应,除了对光环境中实际出现的光谱分布进行直接测量外,别无其它办法。

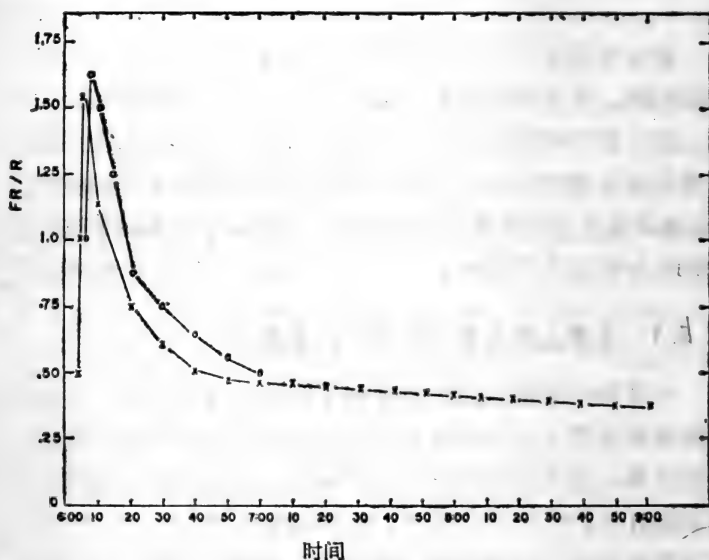


图 11-14 在华盛顿市对两个典型的晴天测量了日出后不到 1 分钟内太阳光中远红光 ( $730 \pm 4\text{nm}$ , FR) 和红光 ( $660 \pm 4\text{nm}$ , R) 辐照度的比值。测量是用一个放在对红光敏感的光检测器上方的准直管进行的,该准直管的接收立体角比来自太阳表面的所有直射光进入所需的立体角大 2 度。用手调整该仪器的位置,使准直管的中心对准太阳的中心,在光路上交替放上两个干涉滤光片,并测量透过干涉滤光片的光通量,相继在两个波长上测量的时间不超过 5 秒。上方的曲线是上午 5 点 47 分,当太阳圆球的上缘出现在地平线上时测量的。而下方的曲线是在上午 5 点 45 分测量的。这两次测量是 1963 年 5 月 31 日和 6 月 1 日从美国华盛顿国立博物馆北旗塔顶上进行的(引自参考文献 47)。



## 11.5.2 商业上和经济上的重要性

如果能用喷撒化学药剂使农作物的光敏色素分子变成  $P_{fr}$  形式,从而调节商品农作物开花和结果的时间,那将有很大经济意义。遗憾的是我们对光敏色素的作用方式及作用位置的了解还不足以设计和合成能够引起这种改变的化学药物。但是,由于光能够调节这种光致变色的变化,所以人们提出并成功地证明了生长在比较大面积上的植物可以用红色激光束来控制<sup>[50]</sup>。不幸的是,能控制的面积还不能大到足以引起商业上重视的程度,因为这需要昂贵的大型激光器。理论上讲,如果所需的功率和光源的大小是现实的话,这样的控制在经济上也许是可行的。但是,从光生物学家的角度来看,更应该了解受光形态建成控制的自然环境中发生的光形态建成及其过程。例如,有人建议在固定轨道上的大型卫星上用大的反射表面使世界一些地区在夜晚也保持光照。技术上这样的卫星是可以建造的,并且 1966 年<sup>[51]</sup>在为了军事目的 Abel 计划中郑重提出过。幸好由于一些担心失去黑暗的夜晚将无法进行天文观测的天文学家的反对和对光形态建成感兴趣的光生物学家的关注,卫星的这种应用还未实现。

如果这样一个反光的卫星偶然发生一个转动,就会使一个辐照度只是满月光的三倍的白光闪光扫过北半球,可以想象到这样一个闪光将会使很多商业上重要的作物不开花或不结果,只要想到大面积的蔬菜植物在入冬以前不能结成果实或种子这种后果,更不必说这种光扰动对于光周期敏感的鸟类和哺乳动物会产生什么样的影响了<sup>[52]</sup>。

联系到上面建议的人造卫星向光生物学家提出的一个问题是:热带植物需要什么样的光周期呢?在赤道附近白昼的长度变化是很小的;因此长期以来人们一直认为在热带地区

光周期的作用是可以忽略的,但是,对巴拿马的一些树种的观察表明并非如此<sup>[53]</sup>。某些温带地区的植物的开花时间在一天12 h 内可精确到 $\pm 15$  min,一些热带植物甚至可以更精确地用来测量白昼的长度。目前我们的确不了解光周期对于大多数热带植物控制到什么程度。

随着新光源的发展也引起了一些光形态建成方面的考虑,经济和省电的钠蒸气灯破坏了我们城市里的一些树种<sup>[54]</sup>。钠灯光谱的红光部分相对来讲比较丰富,由于这种灯能整夜点燃,它可能通过(植物)光敏色素影响树木的生长速度和所需要的天然光照-黑暗的循环,这种循环是树木在首次严霜之前就进入冬眠状态所必需的。像红枫或榆树显然不能种在用钠蒸气灯作常规照明的城市地区,如果种植这些树木,则必须适当地遮蔽灯光。

最后,在我们使用人造光源方面有着越来越多的商业上的重要问题。商业温室的种植者通过调节光周期很容易调节一些作物的生产,例如复活节百合花之类的开花植物、圣诞节用的一品红或一年四季都开花的菊属植物就是用这种方法调节生产的。对世界上很多地区来说,叶菜类蔬菜和像西红柿那样的果菜在冬天是很贵的食品,因此菜农在控制的温室中补种或种植这些作物,并花大量的电能生产这些植物。光形态建成反应在调节光合作用效率上可能是重要的,如果光谱品质以及照光的强度和时间速率都是最佳条件,那么生产每单位鲜重蔬菜所需的电能就将大大地减少。目前我们还不能预计对于以最低的成本来有效的生产出所需要的作物来说什么样的光形态建成的光照条件组合是最好的,因为我们对光合作用和可调节的光形态建成过程之间相互作用中涉及的光生物学实在知道的不够。

## 11.6 结 论

自然界进化出了若干色素，它们能使生物体系对自然界的光环境的涨落作出反应。其中的某些色素系统是单独起作用的，但是为了能使各个物种生存下去，很多色素系统似乎是协调起来起作用的。对大多数这些复杂的过程中所发生的分子事件，我们知道的很少。甚至对我们了解最多的系统——光敏色素也有许多还未解决的问题。例如：①一天之中绿色植物中光敏色素的吸收状态与辐照度和光谱分布两者有什么样的函数关系？②为什么暗处生长的幼苗产生那样多的光敏色素？这些附加的光敏色素有还未发现的作用吗？③为什么生长在森林边缘处远红光丰富的环境的植物在它的种子发芽之前需要较强的光照？这对它有什么好处？④这些种子不大可能在黑暗中发芽，这有什么优越性？

关于光形态建成反应概括地说有下面几个问题：

(1) 太阳光和天空光光谱分布的自然波动有多大？它们是怎样与植物的自身过滤作用相作用来调节生长和形态的？

(2) 对光受体色素被光激发以后发生的任何这些光形态建成过程来说，原初反应的产物是什么？

(3) 对有商业价值的发育过程来讲，是否有什么化学上的方法能取代对光信号的需要？

(4) 当我们发展新的人工光源时，什么样的生物过程将受到光污染的影响？

(5) 还有多少在光控制下发生的其它调节过程有待发现？

解决和回答这些光形态建成的问题不仅是对科学家的鞭策和挑战，而且对人类也有重要和深远的意义。

## 11.7 实 验

### 11.7.1 实验方法

实验 1 光形态建成反应的最简单的证明是比较生长在完全黑暗条件和生长在光照条件下的蚕豆或豌豆幼苗。在生长几天以后就可以在色素形成、茎的长度和叶片面积等方面观察到许多差别。

用两个小花盆装上湿润松软的土,装到花盆的四分之三,并使花盆能够排水,在表面撒播上 6—12 粒蚕豆或豌豆种子,盖上 1cm 厚的湿土,温度保持在 25℃。用两个大烧杯倒扣在花盆上以维持大于 80% 的相对湿度。一盆盖上黑布放在暗室里以保证不曝光,另一盆放在实验室里,在强度大于 100 英尺烛光的白色日光灯下照射 6—7 天。

观察到的大部分差别都属于光形态建成反应。如果比较在两种条件下生长的幼苗的干重,那差别是很小的,因为幼苗把比较大量的食物都贮藏在种子里,因此在这段时期是不依赖于光合作用的。

实验 2 可以用一些生理反应定量地测量光形态建成反应,例如在蚕豆幼苗中测量弯钩的张开或叶盘的扩大。

如果蚕豆幼苗生长在黑暗中,像上面概述的那样,6 天以后在昏暗的绿色安全灯下,在正好子叶下面的茎部切下含有次子叶弯钩的 2.5cm 的一段,把切下的部分放在皮氏(Petri)培养皿里的湿滤纸上,用低辐照的红光( $0.1 \text{ W m}^{-2}$ )照射它们,弯钩张开的角度用半圆规来测量。在实验开始时,黑暗中生长的胚轴钩的短臂和长臂近于平行。在红光照射以后,胚轴钩内部区域的细胞增大,短臂和长臂之间的角度与光注量成正比,对  $1 \text{ mW m}^{-2} 20\text{h}$  的光照观察到的张角大约  $65^\circ$ <sup>[55]</sup>。

如果在短暂的红光照射  $1 \text{ kJ m}^{-2}$ , 照射 30 min 以后, 接着用远红光照射( $0.3 \text{ kJ m}^{-2}$ ), 则胚轴钩张开的程度就减小。

如果用软木打孔器从暗处生长的叶片上切下一些 5mm 的叶组织圆片, 放在用  $5.8 \times 10^{-2} \text{ M}$  蔗糖和  $1 \times 10^{-2} \text{ M KNO}_3$  浸湿的滤纸上, 这些圆片将会增大, 圆片的直径可以用千分尺或解剖显微镜的刻度目镜测量。这组织圆片应从叶子中脉的两边切下, 并在把它们放在皮氏培养皿里以后用红光或远红光照射 10 分钟, 然后把叶组织圆片放进金属盒里(咖啡罐头盒就可以用), 并在  $\sim 25^\circ \text{C}$  黑暗中放置 3 天。由学生们<sup>[56]</sup>获得的典型数值见下表:

处 理 方 法	圆 片 的 直 径 (mm)
远 红 光	$6.47 \pm 0.31$
远红光, 红光	$8.01 \pm 0.37$
远红光, 红光, 远红光	$6.77 \pm 0.45$

这两种实验材料都以定量的方式证明光敏色素系统的红光构型, 远红光构型的可逆性。类似地, 这两种材料都适合于加入像植物生长素、核苷酸或拟光类化学物质(例如钴离子)等外源性物质来研究光照的作用。

实验 3 种子的萌发为证明光敏色素的控制作用提供了一个很好的系统。莴苣(*Lactuca*)和芥菜(*Arabidopsis*)种子用得最多, 但其它种子亦可同样用来试验。很多实验都证明有类似的反应存在。

把种子放在用  $10^{-3} \text{ M KNO}_3$  浸湿的滤纸上使种子湿润(典型地是用三张华特曼 1 号滤纸, 10ml  $10^{-3} \text{ M KNO}_3$ , 50 粒芥菜种子撒布在直径 10cm 的皮氏培养皿上<sup>[8]</sup>, 用黑布把培养皿包上, 放在冰箱中 ( $2-4^\circ \text{C}$ ) 48 h, 表皿应在完全黑暗中处理, 单独地或以不同次序用红光或远红光照射。选择你自己的光注量值或者用与实验 2 中使用的注量差不多的光注量, 种子

特别适合于测量曝光在 1—10000 s 范围的光注量-效应曲线,曝光以后,把培养皿放在黑暗中,芥菜种子放 4 天,莴苣种子在 25℃下放 2 天,然后数萌发的种子数。

实验 4 在光敏色素系统控制下色素的产生可以通过测量芥菜幼苗中产生的红的色素花青苷<sup>[19]</sup>的量来证明。把芥菜子(*Sinapis*)放在玻璃瓶中(5cm 深)用水浸湿的滤纸上,或放在一些透明的小塑料冰箱储藏盒里,播种并在黑暗处生长 36 h 以后光照幼苗,红光的有效辐照度是  $0.7 \text{ W m}^{-2}$ ,远红光的有效辐照度是  $3.5 \text{ W m}^{-2}$ ,在曝光后 3—24 h 内测定时,发现曝光时间 5 min 反应最好。选取 25 棵幼苗,用 30ml 丙醇-盐酸-水溶剂(体积比 18:1:81)提取幼苗的子叶和次子叶,提取时把盛有幼苗的提取瓶(带有塑料盖子的 50ml 玻璃闪烁瓶即可)浸在沸水中煮 1.5 min,带帽的瓶子夹在一个金属架上,以防止顶端喷泄和煮沸时溶剂的过量损失。提取的最后是把瓶子放在室温下冷却 24 h,然后以大约 5000g 速度离心 40 min,在 535 和 650nm 处测量吸收,校正的吸收值按下式计算:

$$A_{535} - 2.2A_{650} = \text{校正的 } A_{535} \quad (11-13)$$

这系统对证明高能辐照反应是非常合适的。测量了 12h 内在红光或远红光连续辐照下产生的花青苷随时间的变化,清楚地看到它是所用辐照度水平的函数<sup>[19]</sup>。

为了快速得到定性的结果,可以通过缩短提取时间或在测量吸收之前过滤提取物对这个实验做一些改动。同样,测定不同照射时间和照射的光注量下产生的花青苷的量 [(强度) × (时间) =  $k$  (常数)],这个系统是证明反比定律(本生-罗斯科定律)成立的一个很好的系统。

实验 5 在蓝光辐射能作用下的光形态建成可以通过测量真菌脉孢菌中光诱导产生的黄色类胡萝卜素来证明。野生

型菌种保存在 Vogel 氏最低限培养基的 2% 琼脂斜面上<sup>[57]</sup>, 用几个盛有 20ml 的添加了 0.8% 的 Tween-80 的 Vogel 氏最低限培养基的锥形瓶, 每瓶里加入几滴野生型菌株 Em5297a 的顶端芽孢的水悬浮液, 把这些锥形瓶放到暗处, 在温度 25℃ 下放 4 天或 18℃ 下放 6 天。在红色安全灯下 (GE-BCJ 60 W 白炽灯) 将由顶端芽孢生长成的菌丝垫从瓶内倒出来, 铺在滤纸上, 在瓷漏斗上抽滤, 然后放在直径 15cm 的皮氏培养皿上, 每个培养皿放 3 个菌丝垫, 这些菌丝垫漂浮在新鲜的培养基上 (每个菌丝垫 2—8ml), 并在与光照时欲用的温度下放在暗处平衡 2h, 用蓝光照射这些菌丝垫 ( $0.1 \text{ W m}^{-2}$ ), 然后让它们在 25℃ 或 6℃ 下在暗处生长 24 h。然后用甲醇 (一单位鲜重用 4 倍体积的甲醇) 提取两次, 每次 15—20 min, 将甲醇提取液合并在一起, 再用 4 倍体积的丙醇提取几次, 直到从菌丝中抽提出所有的色素。把所有提取液合并一起, 再加等体积 5% 的 NaCl 水溶液, 在分液漏斗里加环己烷 (总体积的十分之一) 提取色素。合并环己烷提取物并在硫酸钠上干燥。倒掉环己烷并在 475nm 波长处测量吸收。结果表明, 色素在 25℃ 比在 6℃ 时出现得快, 但在 24 h 发育期内, 在较低的温度产生的全部色素量更多<sup>[32]</sup>。

### 11.7.2 光源材料及简评

对于任何光形态建成实验来说, 辐射能源是很重要的。对于精确的定量实验, 需要精确测量辐照度的仪器 (用标准灯校准的辐射计), 并仔细的控制所用的光谱带宽 (干涉滤片或光学色散系统, 例如光栅或稜镜单色仪)。但是, 用廉价和容易制作的宽带滤光片也能得到很多的信息。比如:

红光源: 冷白日光灯外面包上几层市售的红玻璃纸<sup>[56]</sup>。

远红光源: 安装一个白炽反射探照灯, 在距灯 15cm 处装

上几层市售红的或蓝的玻璃纸，在光通过玻璃纸滤片之前先通过盛在大烧杯中的 10cm 厚的水，这能除去系统中的热能。这套光源可放在简单的木制的或硬纸板做的盒子里。

如果有分光光度计，则应测出滤片的透射率。优质的红光、远红光塑料滤片可以从 Rohm 和 Haas 公司 (Chemische Fabrik, 61 Darmstadt, West Germany) 买到，如果打算做精确的实验，应购买干涉滤片(见 1. 3. 2)。

(庞素珍译 沈 恂校)



## 第12章 光运动

William G. Hand

(西洋学院生物系)

12.1 序 言 .....	377
12.2 向 光 性 .....	380
12.3 趋 光 性 .....	382
12.4 光 激 运 动 .....	389
12.5 细胞器的运动 .....	390
12.6 光 指 向 反 应 .....	391
12.7 结 论 .....	394
12.8 实 验 .....	396
12.8.1 向 光 性 .....	396
12.8.2 趋 光 性 .....	396

### 12.1 序 言

光运动可以描述为任何一种涉及一个生物的整体或部分的空间位移的由光调节的行为反应。为了更好地了解这些反应是什么,以及怎样研究它们,我们必须首先进行分类,或者至少弄明这些反应的基本特征。本章所描述的内容是两个世纪以来比较好的那部分工作的结果,并在 Fraenkel 和 Gunn<sup>[1]</sup> 的经典著作中作了最好的总结。

涉及与生物体对某一方向的光刺激造成的发育上的差异有关的光反应归类为“向光性”。在高等植物中对这些反应进

行了广泛地研究。能动的生物体可能以若干种方式对光刺激作出反应。“趋光性”涉及到朝向一个光源的定向运动，在这种运动中生物体的长轴(从前到后)与刺激光成一直线，于是生物要么朝向刺激的光源运动，要么背向刺激源运动。正像定义中所暗示的，经典著作上把这些反应看成是由于在两侧对称的生物体上对称排列的感受器受到不等的刺激所产生的，这种排列使生物体有可能对于它两侧的刺激强度同时进行比较。趋光性的这种描述很容易用于后生动物，但对于原生生物就必须作某些修改，因为许多原生生物(例如阿米巴)不是两侧对称的，对这些生物可能是通过一个能随时不断地对刺激强度进行比较的一个复合体感受器完成的。不论哪种情况，必须牢记的重要一点是：“趋光性”是对光的定向反应，它需要在光源和其背景之间、在两个不同强度的光源之间、或者在一个光源随时间不断变化的强度之间作出比较。为了表示反应相对于刺激源方向，人们把朝向光刺激运动的反应叫做正趋光性，而把背向光刺激运动叫做负趋光性。

除了定向运动外，还有非定向运动，这种运动可能受光刺激的影响而造成生物在环境中的某一光亮区域或某一黑暗区域里的聚集。这类反应通称为光激运动 (photokineses)，Gunn 等人<sup>[2]</sup>将其描述为由于刺激强度的变化所引起的“一般的、非定向的、无规则迁移活性上的变化”。迁移特性的这些变化可以有两种基本类型：由光刺激引起的直线速度的改变(直向运动 orthokinesis)，或在改变方向的速度上的变化(迴旋运动 klinokinesis)。重要的是要认识到这些反应与刺激的方向无关，而只与周围强度的变化有关。因此，为了在描述运动时避免“正”的和“负”的这两个形容词的方向上的含义，人们就把活动力与刺激强度成正比的反应称为正运动 (direct kineses)，而把活动力与刺激强度成反比的反应称为反运动 (inverse kin-

eses)。例如,如果生物游动速度随着周围光强度的增加而增加,这就是对光的正直向反应。如果生物随着周围光强度的增加而降低了它随意向某一方向偏转的速度(即前进的较直),这就是对光的反迴旋运动反应。图 12-1 里对这些反应作了一个小结。

还有一类与光相关的运动我必须加以考虑,这些运动涉及到这些生物利用光源作为它们在迁移或飞行时的参考点,这种现象叫做(光-指向反应,对包括甲壳动物、昆虫和鸟类在内的几种后生动物形式已经描述了这些反应。在其中的很多反应中,光源(通常是太阳)的偏振平面在动物群的迁移和养护中,在羊群或鱼群的形成中起着导航的作用。

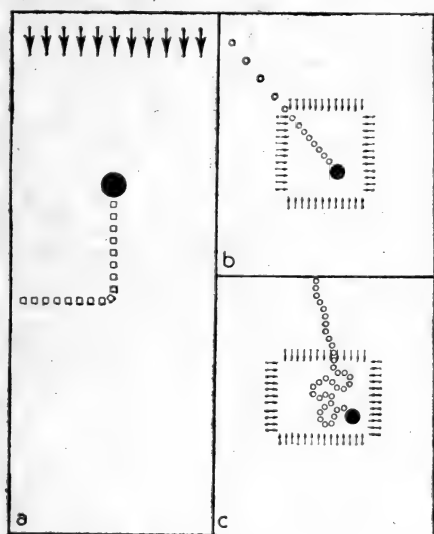


图 12-1 由光刺激产生的三种类型的能动性反应。(a)趋光性,请注意刺激(箭头)的方向性质;(b)、(c)光刺激运动:(b)图示一个反直向运动;(c)给出一个正迴旋运动。注意(b)和(c)的刺激是不定向的。

## 12.2 向 光 性

向光性的研究一直是主要研究激素对高等植物生长的控制。查理·达尔文和他的儿子弗朗西斯 (Francis) 以卡那瑞草 (canary grass) 幼苗进行实验<sup>[3]</sup>, 达尔文父子看到幼苗都朝明亮的窗户弯曲。为了确定接受光刺激的是植物的哪一部分, 他们确定种三组植物: 一组只露顶端将其余部分遮盖起来, 另一组完全不遮盖, 第三组只覆盖顶端, 然后把这些幼苗放在窗户附近, 并观察植物的向光性。第二天达尔文看到完全曝光的幼苗和只让顶端见光的幼苗都明显地弯向窗户, 而遮盖顶端的幼苗则没有表现出任何的向光性。可见接收光刺激的表面显然在顶部。

在达尔文的实验及后来 Paal 和 Boysen-Jensen 实验的基础上, F. Went 又进行了一系列实验, 这些实验为后来植物激素的研究奠定了基础<sup>[3]</sup>。Went 1926 年作为研究生在荷兰的乌得勒支他父亲的实验室从事工作, 他把燕麦 (*Avena sativa*) 胚芽鞘的顶端取下, 并放在暗处的琼脂上, 过一段时间以后, 他把放过胚芽鞘顶端的琼脂块不对称地放在准备好的去顶端的胚芽鞘上, 结果, 这个胚芽鞘放有琼脂块的一侧生长迅速, 从而导致向相反的方向弯曲 (图 12-2)。这实验表明在植物顶端存在一种化学生长物质。接着, Went 又用实验证明: 在一侧照光的胚芽鞘里, 有较多的这种生长物质扩散到放在植物顶端背光侧下方的琼脂块中, 他把这种琼脂块物质命名为植物生长素。在二十世纪三十年代初期, 荷兰的 Kogl 和美国的 Thimann 从化学上描述植物生长素, 并给予化学名称为吲哚乙酸 (IAA)<sup>[4]</sup>。

自从这些开创性的研究以后, 人们已经弄清楚了植物生

长素在向光性中的作用。Briggs 及以后的 Leopold<sup>[5]</sup> 证实了植物生长素从胚芽鞘的照光一侧向背光一侧的横向转移，这就造成了幼苗背光一侧上的细胞不对称的伸长和生长，使幼苗弯向照光的方向。

确定担负这种生长反应的感受器的性质和作用方式，仍然是一个没有解决但是引起广泛兴趣的问题，虽然已对某些高等植物(特别是燕麦)作了研究，但是许多研究者却把相当大的努力放在真菌类的须霉菌属(*Phycomyces*)上(图 12-3)<sup>[6]</sup>，这种真菌的孢子囊蒂所呈现的向光性作用光谱有三个主要的峰值，分别在 385nm, 455nm 和 485nm。这个作用光谱表明类胡萝卜素或者黄素是可能的受体色素。然而须霉菌不含有大量的胡萝卜素，因此比较有希望的可能是黄素蛋白。在某些情况下，这些蛋白在须霉菌中是以晶体形式存在的。Wolkin 认为这样的晶体可能是一个光感受器，他提出：类似的黄素类晶体同脊椎动物的视网膜系统有联系<sup>[7]</sup>。不消说，只有

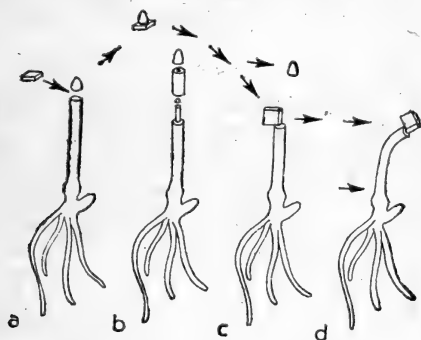


图 12-2 F.Went 确定燕麦胚芽鞘向光反应的化学本质的实验。(a) 将胚芽鞘的顶端剪掉；(b) 剪下的顶端放在琼脂块上并使其放置一段时间；(c) 然后将琼脂块转移到去顶端的胚芽鞘上；(d) 幼苗发生弯曲 [取自 F.B.Salisbury and C.Ross, *Plant Physiology*, P.446, Wadsworth, Belmont, Calif. (1969)]。

感受器是由什么构成的这一问题解决之后，才有可能对感受器的作用模式进行适当地描述。

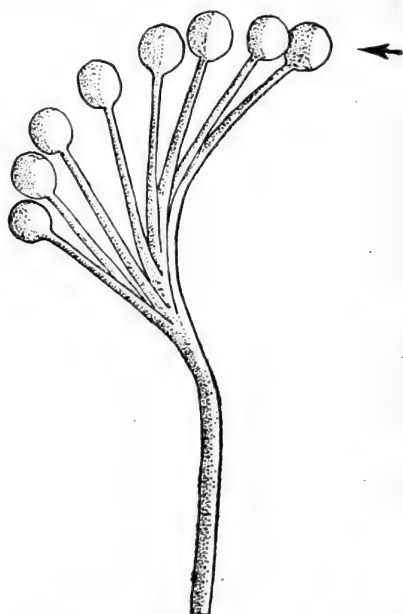


图 12-3 须霉菌孢子囊蒂的向光反应。位置上的移动表示每隔 5 分钟的变化。箭头指示刺激源的方向(取自参考文献 6)。

### 12.3 趋 光 性

由于整个生物增加了一维迅速的运动，因而给趋光性的定量描述带来了许多技术上的问题，其中包括关于是什么构成了趋光反应的问题。历史上，趋光性研究是建立在对能动的生物直接观察的基础上的，特别是观察原生生物。在上世纪的整个后半叶，研究工作者们观察了能动的藻类细胞向着定向光刺激的迁移<sup>[8,9]</sup>。

最近几年,采用了各种技术来对趋光反应进行研究和定量说明<sup>[10]</sup>。这些技术可分为两大类:群体运动的方法和单个细胞生物的方法。所有群体运动的方法都用了测量细胞悬液光密度改变的原理。这个测量的基本部件有:一个盛有细胞悬液的烧瓶,一个试验灯,和一个与记录用电位计连接的光电池。由于细胞对测试光的反应,它们会改变通往光电池的光路上的细胞密度,密度的变化又以电位的变化记录在记录仪上。这种系统可以精确地测量光刺激对细胞群体产生的结果,但不能测量细胞达到这个结果的过程。许多研究者都未能越过这条重要的分界线,并且因此下结论说他们正在对趋光性进行定量描述,实际上,他们当时所观察的也许是趋光性,也许是光激运动或者是两者结合在一起造成的结果。

单个细胞的方法是由显微镜、记录装置(胶片、电视摄影机),视野照明器(通常经过滤光成为趋光上“中性”的波长)和刺激光源组成。待观察的细胞放在显微镜镜台上的小杯或井型载玻片中,在与显微镜镜台表面平行的一个平面上对细胞进行光刺激,把反应记录下来。最近, Davenport 及其同事<sup>[11]</sup>已经成功地把计算机同一个闭路电视显微镜技术结合起来,这个系统在密切观察趋光作用的工作中极有希望,因为它能同时观察许多反应生物的微小运动,这系统唯一的缺点是它只能有效地用在主要在  $x$ - $y$  平面上运动的生物。Berg 及其同事<sup>[12]</sup>已经用一种机械化的显微镜镜台实现了对运动的三维分析,在这个系统中细胞保持不动,而让显微镜镜台沿  $x$ 、 $y$  或  $z$  方向移动。这三个方向的运动能传送给一台图纸记录仪,画出细胞运动的三维图形。这个系统的主要缺点是一次只能观察一个细胞,因此,要得到关于一个群体的运动的统计学信息则是一个工作量很大的任务。对这些方法的全面评述可以参阅 Hand 和 Davenport 的文章<sup>[10]</sup>。

人们也许首先会问：趋光性是不是以同样的方式出现在所有生物中间？在后生动物中，感受器成对地安排在两侧成为一个规律，因此这种形式的动物与那种形式的动物的反应在道理上应该是相同的，正是在单细胞生物中人们观察到了差别。比如，人们已经广泛研究了的眼虫藻 (*Euglena*)<sup>[13]</sup> 表现出的趋光反应大大不如任何一种后生动物来得精确。早期的研究者，例如 Jennings<sup>[8]</sup> 和 Mast<sup>[9]</sup> 观察到眼虫藻细胞按照光刺激的方向相当精确地一步一步地移动它的体轴，直到细胞本身的长轴和刺激方向相平行。由这种运动得到的最为广泛接受的一种假说认为，在这种细胞上存在着一个单个的光感受器，这个感受器通过一个辅助细胞器——眼点，在两点上同时测量刺激光强度来确定光刺激的方向。这个眼点位于感受器的旁边，当眼虫藻旋转时，它周期性地“遮住”感受器，这短暂的强烈的瞬变讯号引起鞭毛运动的瞬息变化，结果使它的长轴偏向游泳的方向（许多作者用“恐惧反应”这个术语形容这个现象）。当感受器的刺激信号的这些周期性变化停止时，细胞便要么朝向光源，要么背向光源，这种反应扼要地表示在图 12-4 中。朝向刺激光源的细胞将使其感受器持续地受到光照，而负趋光的眼虫藻将使其感受器继续被细胞内大量吸收光的细胞器遮蔽。这种性质的反应过程同任何两侧对称的后生动物相比是缓慢的。

除 Jennings 和 Mast 的早期观察以外，还有什么资料支持遮蔽假说吗？遗憾的是，在眼虫藻情况下，真正支持这种假说的研究工作很少，一个原因就是因为这细胞的趋光反应难以观察。有另外一些细胞，它们对这个假说的支持要好得多，但对假说要作一些修改。这类研究涉及海洋的双鞭甲藻，它不像眼虫藻，双鞭甲藻的趋光反应容易观察，并且是完全可以预测的。双鞭甲藻的反应在程度上而不是类型上与眼虫藻不



同,双鞭甲藻受到光刺激便停止游泳(这种“停顿”反应取决于刺激强度),并作单纯的前后轴旋转,直到面向刺激,然后开始恢复向前的游动(图 12-5)。和眼虫藻相比,这是非常迅速的反应,因为它在几毫秒到半秒钟之内就完成了,时间的长短取决于光刺激的强度。最近的研究给出某些有关双鞭甲藻细胞如何实现取向的征兆<sup>[45]</sup>。可以认为用眼虫藻看到的“恐惧反应”类似于双鞭甲藻的“停顿”反应。在刺激之下双鞭甲藻产生一种特殊的可预见的鞭毛反应,这个反应可能直接关系到细胞的重新取向,执行器是如何与感受器发生联系的问题还在猜测。在这种细胞中有一些橙色的像眼点样的细胞器,但它们的位置和数目在细胞与细胞之间变化很大,通常不像在眼

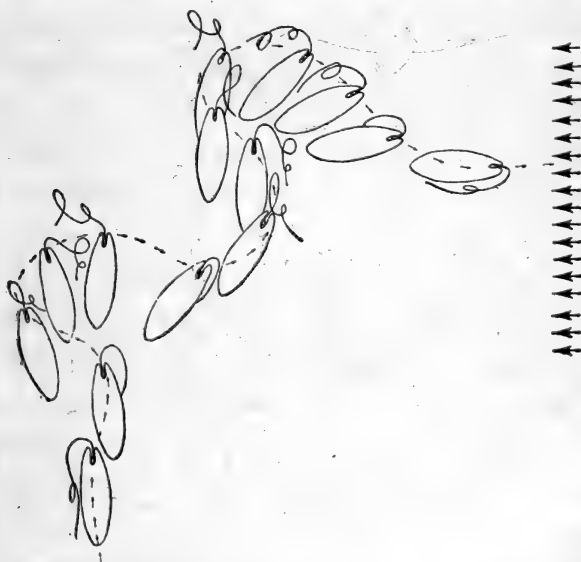


图 12-4 眼虫藻 (*Euglena*) 细胞的趋光反应。图中每两个细胞位置之间相隔 0.1 秒,箭头指示定向刺激的区域。注意鞭毛迫使藻细胞做不断地螺旋形波浪式运动(根据参考文献 13 综合)。

虫藻那样紧靠鞭毛的基部。此外，还有很多红棕色的含类脂的有色体，假若感受器区域紧靠细胞表面，那么任何一个这样的有色体都能起遮蔽器的作用。

感受器本身又是什么呢？对所设想的感受器最好的证据来自于电子显微镜的研究。像在海虫藻里一样，双鞭甲藻应该有一个与鞭毛基部连在一起的感受器。的确，在关系很近的一种生物叶状薄甲藻中 (*Glenodinium foliacium*)，所设想的感受器似乎是位于细胞中两个凹痕的连接处（即位于凹沟与环带的连接处）<sup>[16]</sup>。在双鞭甲藻中同样位置的感受器将能使周围的各种红色质体起一个功能性遮光体的作用。如果进一步设想凹沟和环带的作用，用它们作为有功能的光通道，我们

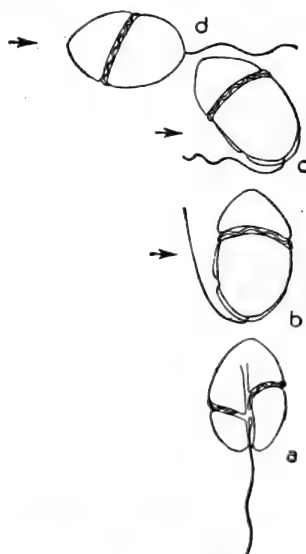


图 12-5 海洋的双鞭甲藻 (*Gyrodinium*) 的趋光取向反应。每一次位移代表  $\sim 0.07$  秒。(a) 一个游泳的细胞；(b) 游泳细胞受到光刺激，鞭毛运动停止；(c) 鞭毛运动恢复；(d) 细胞转向刺激，直到处于和刺激平行的平面时为止，这时又恢复了正常的游泳(取自参考文献 14, 15)。

就能预言双鞭甲藻细胞在趋光取向中所涉及的一连串事件。当细胞受刺激时,它就停在一个位置上,使凹沟-环带连接部面向光源,这反应包括一个单纯的但是可以预计的纵鞭毛的横向重新调整位置,用直接摄影证明了这两点推测。当纵鞭毛恢复其煽动时,它以预计的方式转动细胞,因为当纵鞭毛开始煽动时,它又同时使自己复原到拖在细胞后面的正常位置上,这样做的时候鞭毛使细胞转动以便细胞朝向光刺激,细胞的前部连带它上面的有色体一起有效地遮住感受器,使连续的光刺激照不到感受器上,于是细胞朝着光的方向恢复向前的游动。假如细胞偏离了与刺激平行的路线时,光将进入凹沟的光通道,并部分地刺激感受器,引起鞭毛反应,于是又根据光刺激重新调整细胞的方位。人们已经观察到并记录下这样的一些反应<sup>[6]</sup>。

如果下结论,人们可以说趋光取向包括两步(至少对于到目前为止研究过的生物是这样): ①感受器上刺激水平改变; ②刺激水平的改变又引起可预知的鞭毛反应,从而使细胞同刺激源重新排成一线。正如我已经指出的那样,假若这里提出的假说要变成肯定的理论,还需要继续研究这些细胞反应。

感受器是由什么构成的呢? 关于后生动物,可参阅第 10 章,在该章中关于视觉系统作了详细的描述。至于单细胞生物,电子显微镜的研究对于确定感受器的性质提供了当前最有希望的手段。人们可以在脊椎动物视网膜的外视杆段和带鞭毛的原生动物的原始感受器之间直接进行比较,两者都有一个片层结构,一层是起源于鞭毛或纤毛的物质,一层是色素——类胡萝卜素,有类胡萝卜素说明光的感受中涉及到化学物质(参阅第 10 章)。间接证据表明类胡萝卜素与单细胞形式生物的感受器有关,也就是说作用光谱的分析与吸收光谱的数据相互对应的情况支持了这种看法。大多数研究过的生

物的作用光谱是在光谱的蓝区，这正好符合在这些细胞和其他类似细胞中发现的类胡萝卜素的吸收光谱。在眼虫藻中有一种黄素类物质(可能是核黄素)，这说明这种黄素类物质是感受器的色素<sup>[17]</sup>。

某些辅助色素还与细胞的光感受状态有关，最明显的是光敏色素<sup>[18]</sup>。在这种情况下，这种色素控制着反应的正负和敏感性。人们也必然想到像叶绿素之类的色素可能对海藻鞭毛的反应起一种间接的作用。

下一个重要的问题是：光刺激是如何转换成某一种行动的呢？后生动物的接收和转换作用涉及类胡萝卜素的异构化，这种异构化又通过某种方式转换为电脉冲。目前正在进行许多有关这个系统中从一个化学状态到一个电状态的信息变化机制的研究。单细胞生物中信息传递的本质完全是推测的，像在后生动物中一样，可能也涉及电转换。人们在有趋光性能的双鞭甲藻细胞中记录了膜电位，膜电位可能与有纤毛的草履虫的逆游泳反应有关<sup>[19]</sup>。这种小而可测量的电位直接与草履虫的纤毛扇动引起的倒退有关，因此这种膜电位可能接触到了与光定向连系在一起的鞭毛扇动的变化的本质所在。人们可以设想，光刺激引起的色素的初始反应“触发”了一连串类似于平衡的“氧化还原”状态的事件<sup>[13]</sup>，这一串事件将造成电子的流动，从而改变附近的膜的流动态。由于鞭毛在生化上可以认为是一“小型的肌肉”，因此改变界面膜的状态可能导致鞭毛收缩反应的变化<sup>[20]</sup>。此外，还应该考虑鞭毛的可能的压电性质。正如 Jahn 和 Bovee<sup>[13]</sup>已经讨论过的，鞭毛是以一种准晶体状态存在，因此它应该是有压电性质的，如果是这样的话，由初始光化学事件产生电压变化可能引起鞭毛的局部弯曲，并改变它整个的扇动方式。这里当然有许多不确定的东西，但是这些假说的某些方面是可以标准生

理学剂量-反应方法加以检验的,这个很复杂的问题的解决需要比较透彻地了解膜的系统以及它们与其它亚细胞成分的相互作用。

## 12.4 光 激 运 动

和趋光性不同,光激运动 (photokinesis) 同光刺激的方向无关而与刺激的强度有关。扁虫 (*Planaria gonocephala*) 在完全黑暗中以平均每秒 57mm 的速度运动。当它被放在昏暗的光线下时,其运动速度大约增加 25%<sup>[21]</sup>。这一反应在功能上的意义是使这种生物有效地“藏”在黑暗之中,这个想法是和扁虫的生活习性一致的,因为人们经常在岩石下面和其它黑暗的地方找到它们。这种反应是一种对光的正光激直向运动,证明这种反应并不困难,因为可以把它们拍照下来,并及时测量和标明其路径的长度。另一方面,证明光激迴旋 (klinokinetic) 反应是比较困难的,因为要在连续偏转的路程上测量角度的改变相当困难,而且常常带有主观的因素。Ullyott<sup>[22]</sup> 对 *Dendrocoelom lacteum* 进行了这样的研究,他用旋转角作为改变方向的速率 (RCD) 的度量,随着照明强度的增加, RCD 值也相应地增加。但是,一定时间以后,扁虫的感觉就适应了,对所给的高强度光照的 RCD 值重又恢复到正常水平,这导致 *Dendrocoelom* 在黑暗处聚集,因为当光照水平降低时 RCD 的水平也降低,于是迫使扁虫寻找最暗的地方休息。相反,当强度增加时,由于 RCD 值高,扁虫前进的速度就减慢了。Rohlf 和 Davenport<sup>[23]</sup> 从数学上检验了这种对光激迴旋反应的适应性的意义的解释。如果把一个假想的“臭虫”放在一个网格上,并且给它非定向的刺激,所产生的光激迴旋反应将把“臭虫”引向网格上的某一预定位置。

往往难于把这两类光激运动分开,因为每一个成分往往是在总的能动性反应中观察的。Surtees<sup>[24]</sup>用几种甲虫进行试验,为了测定两种反应中主要是哪种反应引起所看到的分散或聚集,他设计了一种简单的分析方法,他用所走的距离(DT)与直线位移(LD)的比值来衡量路径的相对不规则程度或旋转强度。按照这种方法:“如果DT大大减少,而DT/LD没有减少,则光激运动的机制主要是速度的改变。如果DT有所减少或保持不变,而DT/LD显著变大,则机制主要是路径不规则程度的加剧”。这一简单的比较消除了设计演示光激运动的实验中的很多问题。但是,在实验设计上仍然留下一个主要的问题,这就是要保证试验的刺激不给出任何方向性的问题。

在运动反应中涉及的接受光的表面可能是一些位置一定的感受器,或者可能是某些一般的膜反应或组织反应。例如,草履虫(*Paramecium*)的回避反应就可以划在迴旋运动类里,它不需要任何特殊的感受器,而是细胞前部的质膜(细胞膜)状态改变的结果。当草履虫遇到一个物体时,物理接触使膜发生变形,引起离子流的改变,于是产生纤毛的复位<sup>[19]</sup>。当膜重新建立正常的离子流时,纤毛又恢复正常的扇动方向,这一过程一直重复直到细胞绕过障碍物为止。

## 12.5 细胞器的运动

最后必须考虑细胞内细胞器的取向运动<sup>[25]</sup>。这些反应可以是运动性质的,也可以是趋向性质的。例如,在伊乐藻属(*Elodea*)和苦草属(*Valisneria*)中叶绿体的旋转流动就是围绕细胞内壁的细胞质运动的结果。这种胞质环流能被光的强度所改变,较高的强度可提高运动的速度,由于看不到任何的取

向,所以这种运动纯属直向反应。

几种藻类的叶绿体取向运动已经得到证实,而取向的叶绿体在功能上的意义在于最大限度地利用光能。在这些反应中,叶绿体可以主动运动,也可以随胞质环流被动地移动,无论哪一种情况,人们都还不大了解这些运动是如何发生的。这类细胞中研究得最充分的一种是转板藻(*Mougeotia*)细胞,每个细长的转板藻细胞含一个扁平的叶绿体,当用低强度光照射时,这个扁平的叶绿体从侧面的位置转到面向刺激的位置,这个反应可以被宽度很窄的光刺激所触发。在完全黑暗的条件下,只要一刺激,细胞就发生反应,这种细胞里的光感受器看来是一种光敏色素,这种色素可能位于原生质膜上,对两个限定的红光波长 660nm 和 730nm 发生反应。叶绿体的位置看来由两个主要因素所决定:一个因素是光敏色素分子的取向。第二个因素是任何时刻系统中 P 660 与 P 730 的比值<sup>[25]</sup>。光敏色素分子有很强的两色性取向,它们的主要光吸收矢量的方向平行于原生质膜的表面,而和细胞的长轴倾斜。这种取向产生一个吸收梯度,朝前的面(正面)和朝后的面(背面)吸收的能量大约是侧面的两倍。用红光照射时,P 660 变成 P 730,建立起一个 P 730 的梯度。叶绿体将这样取向:使它的边缘最靠近 P 660(避免和 P 730 紧密结合),因此,这种取向就使叶绿体的扁平表面对着光,这个反应画在图 12-6 上。就控制取向行为的感受器——执行器系统来说,这个例子是比较独特的,它提供了观察这些体系的一种令人兴奋的新方法。

## 12.6 光指向反应

在二十世纪四十年代后期到六十年代中期进行的很多研

究指出，许多动物利用太阳作为迁移和积累食物活动的指向盘。最常引证的有两项研究：一个是欧椋鸟 (starling) 的飞翔，另一个是蜜蜂的“摇摆”舞。

在 1953 年，Karl von Frisch<sup>[26]</sup>报道蜜蜂能通过舞蹈把食物来源的方向告诉给其他的蜜蜂，这种舞蹈是由绕圈和向前摇摆组成的。后者按照太阳相对于蜂房和蜜源的相对位置通报食物的方向，Von Frisch 看到，这角度在一天之中按照太阳的方位而改变。(图 12-7)<sup>[27]</sup>用易位实验也证明在太阳周期和蜜蜂舞蹈取向之间有类似的关系<sup>[28]</sup>。有人训练蜜蜂使它们在白天的某一特定的时间飞向长岛饲养站，以后人们在一天夜间把它们运到加利福尼亚州的达维斯，第二天早晨蜜蜂正常地觅食，但它们寻找食物的方向发生偏移，偏移的角度相当于达维斯和长岛之间太阳方位角的改变。但是，应当说明，最近几年人们对蜜蜂舞蹈中包含信息的假说提出了异议，Wenner 和 Wells<sup>[27]</sup> 提出一个更简单的假说，它用工蜂对香味的辨别来解释它们确定蜜源位置的能力。

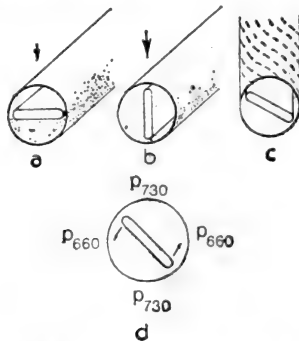


图 12-6 转板藻 (*Mougeotia*) 的叶绿体旋转反应。(a) 一个细胞，其叶绿体面向低强度的刺激；(b) 叶绿体横过来，以对高强度刺激作出反应；(c) 这种藻细胞原生质膜上光敏色素分子的两性取向；(d) 说明叶绿体运动受光敏色素 P 660 和 P 730 的位置调节的横切面(引自参考文献 25)。



人们发现欧洲椋鸟 (*Sturnus vulgaris*) 是利用太阳作为参考点飞行的<sup>[29]</sup>。如果把欧洲椋鸟放在一个看不见地平线和路标但可以看见太阳的笼子里时,虽然受到这样的限制,欧洲椋鸟(处于迁移状态下的)虽然关在笼子里仍将拍打翅膀或企图飞翔。在迁移行为中太阳的作用可以由鼓翼的方向来确定,如果太阳被云彩遮蔽或者从装置里看不见太阳,就观察不到任何定方位反应。当用反射镜改变鸟所看到的太阳的方向,则可以预言定向反应也会改变,这样的定向“飞翔”能维持几个小时。

上述研究以及对于脊椎动物和无脊椎动物的其他研究都清楚地表明太阳是运动中的参考点。必须指出,这种运动不是真正的趋光运动或光激运动,但可能含有这两种运动的成分。比如,甲壳类水蚤属的长刺蚤 (*Daphnia longispina*) 白天移栖离开海岸,夜晚又返回<sup>[30]</sup>。当把它们放在一个圆形树脂玻璃格子上时,水蚤就在垂直海岸线方向上游动,在黑暗中这些运动则是杂乱无章的。白天,这种运动包含着趋光性,但不是直接地朝向或背向太阳,而是同太阳成某一角度,这个角度取决于海岸线相对于光源的位置。

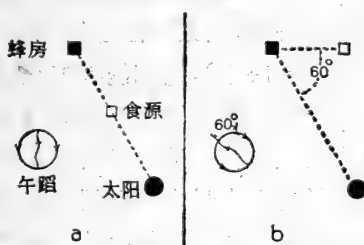


图 12-7 蜜蜂的以太阳作为指南针的辨向反应和它与蜜蜂舞蹈的关系。(a) 当食源放在与太阳和蜂房成一直线的位置上时,舞蹈的向前方向垂直于蜂房的表面;(b) 当食源偏移时,舞蹈的角度也相应地改变 [引自 P. Marler and W. J. Hamilton, *Mechanism of Animal behavior*, P.543, Wiley, N.Y.(1967)]。

人们对诸如海滨跳蚤 *Talitrus saltator*<sup>[31,32]</sup> 所表现出的按月亮定向的现象不大注意,当把这些甲壳类放在一个圆柱形房间里的时候,它们立刻朝着月亮的方向移动,这显然是正的趋光反应,但是比起按太阳定向运动的类似反应,这是对很弱的光的趋光反应。然而,当人们把 *Talitrus* 放在海滩上时,它就表现出更奇妙的以月亮为参照的定向反应。海滨跳蚤的生物钟机制的特征看来是对地球和月亮相对位置变化的一种代偿。

## 12.7 结 论

光调节的行为如何给生物带来裨益往往由反应的性质表现出来,但是在某些情况下,一种生物的生态特征可能很微妙地受到这种生物的行为的影响。

趋光性对于鞭毛虫来说在形态学上是一个重要的反应,因为它把这种光合作用细胞放在最佳的光环境中。几种海双鞭甲藻的垂直迁栖是与日光的周期性变化相对应的,白天,这种生物上升到水面附近,晚上又沉下水去<sup>[33]</sup>。如果这些细胞没有趋光能力,而且只停留在某一固定的深度(这个深度由细胞解剖学上的物理特性决定),它们能有繁殖自己的功能吗?它们还能进行足以产生细胞分裂所必需的“超额”能量的光合作用过程吗?我们可以检验和进一步研究这些问题,才能了解趋光性在群体生长的动力学中的作用。对于这个系统人们还能提出一些其他的问题,例如:什么样的环境因素能改变“正常的”光反应?温度是如何在行为、生理或生化水平上影响光反应的?这些问题中还没有一个被充分地加以研究。

人们发现:当海生生物幼虫从一个阶段发育到另一个阶段时<sup>[33]</sup>,它们就改变光反应的正负号,这种反应的功能意义还

不清楚,尚需适当地进行研究,对这种行为最显而易见的解释是: (1)这种反应使生物处于水中比较有利的摄食位置, (2)这种反应使生物处于防止被捕食的最安全位置。然而事实上,在海洋鱼类、甲壳类、环节动物以及其他较小的生物的总的行为表现上,光取向反应是它们的一个共同特征。

正是在这些生态学问题的研究中,人们才了解了生物光行为的普遍重要性。一个简单的行为上的改变可能使一个在解剖学特征上适应环境的物种延续了无数代,因此人们以极大的兴趣来考察这种简单的行为上的改变所可能带来的深远意义。例如:如果海中双鞭甲藻没有趋光反应,如果它们不可能在行为上变换它们的光环境的话,它们能像今天这样生存吗?虽然海洋中的双鞭甲藻达到它们现在的状态已经经历了几次解剖学上的适应性变化,但是如果它们用其他的一些办法来应付这个生存问题的话,那会遇到多么大的困难呢?

现在让我们从实践的观点考虑一下光运动在适应环境上的重要性,我已经详细地论述了双鞭甲藻 *Gyrodinium* 的趋光反应,双鞭甲藻和它们的同属是构成通常所说的“红潮”的主要生物,红潮的发生是世界范围的,但至今没有找到任何办法来控制红潮,很可能双鞭甲藻的趋光反应是决定甲藻群体在数量上的爆炸性增长是否与红潮有关的一个主要因素。水中存在的一些特殊离子( $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ )可能提高这种细胞的总的敏感性,从而使它们较长时间地停留在水面上,这种长期留在水表面的情况再加上存在着足够的营养就能产生加速细胞分裂所需要的过量的生物化学能。我上面所说这些纯属推测,不过人们可以很容易地看到它提出了很多未来需要探索的领域(参阅 6.3.3)。

这些问题和概念需要实验来证实。只有在有了这些实验资料以后,我们才有可能清楚地了解光运动的重要性,为了统

一现有的知识并揭示新的现象,必须进行学科之间的合作。

## 12.8 实 验

### 12.8.1 向光性

可以利用燕麦的胚芽鞘很容易地演示向光性,燕麦种子可以从生物供应站获得。

用前让种子在 22—24℃ 下,在黑暗中萌发 24 h,在萌发的前 12 h 期间,给幼苗照射 5 min 的红光,24 h 以后,把幼苗转移到用湿滤纸盖着的烧杯或托盘中,使其穿过滤纸插进去,于是滤纸支持着胚芽鞘,而根扎入水里,让胚芽鞘继续生长直到它们大约有 30mm 高(3 到 5 天),重要的是整个过程需在黑暗条件或绿色安全灯下进行。

给胚芽鞘以不同时间(30 s, 1、5、15 min, 1 h)的定向白炽灯光照,并记录结果,设计一种定量记录的方法,并画出光照的效果。

可以用 Went 设计的方法进行加入向光性的诱导剂(植物生长素)的进一步实验,关于这个实验的详细描述请参阅: A.Dunn and J.Arditti, *Experimental Physiology*, Holt, Rinehart, Winston, New York (1968)。

### 12.8.2 趋光性

可以用初期培养的有鞭毛的眼虫藻(*Euglena gracilis*)简单地演示光致聚集现象。

眼虫藻可以由生物供应站得到的初始培养液加 2—3 l Difco 眼虫藻培养液(肉汤)来制备眼虫藻的单胞藻悬液,这个悬浮液应在阳光充足的地方放置约一周时间直到变成鲜绿色,然后把一些细胞悬液倒入一个用硅水泥把两块玻璃板粘

结在一起制成的大槽子里 ( $20\text{cm} \times 20\text{cm}$ ), 从一侧用幻灯机光照并把一个图象投影在该液槽上, 这样照射 5 min 以便眼虫藻聚集, 然后关掉幻灯机, 这时应有用眼虫藻“画出”的那个投影的映象。然后由于细胞又随意分布, 影象将渐渐消失。

为了测定这个反应的光谱敏感性, 可用彩色幻灯片, 这些幻灯片可以用从物理或化学教课书上拍摄的光谱图制成。注意眼虫藻在什么位置集聚得最多, 并把这个位置直接与液槽上光谱显示的位置联系起来。

为了确定这个聚集是由于趋光性造成的还是由于光激反应造成的, 建议用显微镜直接观察细胞, 其基本方法步骤已在 12.3 和 12.4 中讨论过。

(庞素珍译 沈 恂校)

# 第13章 光合作用

David C. Fork

(华盛顿卡内基学院植物系)

13.1	引言 .....	399
13.1.1	光合作用是怎样进化的? .....	400
13.1.2	光合作用概述 .....	401
13.2	植物中的光合作用色素 .....	403
13.2.1	叶绿素在活体内的状态 .....	403
13.2.2	藻类和高等植物中色素的分布 .....	405
13.2.3	类胡萝卜素的功能 .....	409
13.3	光捕获和光化学转化 .....	409
13.3.1	光的吸收和色素的荧光 .....	409
13.3.2	滞后荧光 .....	410
13.3.3	能量传递 .....	411
13.3.4	反应中心 .....	412
13.3.5	光合作用单元 .....	413
13.4	光合作用研究中的光谱学方法 .....	414
13.5	在藻类和高等植物光合作用中的两个光化反应 .....	415
13.5.1	增益和双光反应 .....	415
13.5.2	Hill-Bendall 图 .....	417
13.5.3	两个光系统间的光分布 .....	419
13.6	光合作用中的电子输运和两个光化学系统 .....	420
13.6.1	光系统 I .....	420
13.6.2	光系统 II .....	423
13.7	光合磷酸化作用 .....	428

13.7.1	不循环的和循环的光合磷酸化作用 .....	428
13.7.2	高能中间产物和化学渗透假说 .....	429
13.7.3	色素的电化学变化和吸收位移 .....	432
13.8	光合作用的结构组织 .....	434
13.8.1	叶绿体 .....	434
13.8.2	片层、基粒和基质 .....	434
13.8.3	基粒叶绿体和非基粒叶绿体 .....	435
13.9	二氧化碳的固定 .....	436
13.9.1	Calvin-Benson 循环或 C <sub>3</sub> 碳循环.....	436
13.9.2	C <sub>4</sub> 循环 .....	437
13.10	作为能源的光合作用 .....	438
13.11	展望 .....	442
13.12	实验 .....	443
13.12.1	叶子中主要色素的分离和鉴别 .....	443
13.12.2	与 DCIP 的希尔反应 .....	444

## 13.1 引言

光合作用是将光能转变成稳定化学能的过程，这个过程包括色素对光的吸收，能量传递、反应中心对能量的捕获或稳定、启动从给体分子到受体分子的化学反应。这个过程之后是由电子输运所组成的一系列氧化还原反应，电子输运导致还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 和腺甙三磷酸 (ATP) 的形成。固碳反应能够进行就是利用了 NADPH 和 ATP 分子中的能量。可以从许多角度来研究光合作用，包括从物理学家、物理化学家、生物化学家、生物学家、生态学家和农学家的角度研究光合作用。

本章侧重于绿色植物的光合作用。细菌的光合作用在许多书刊中都谈到了<sup>[1-3]</sup>。最近出版了许多关于光合作用的评

述和专著，在这些评述和专著里可以找到比本章更多的资料<sup>[4-14]</sup>。

### 13.1.1 光合作用是怎样进化的<sup>[15,16]</sup>?

远古时代地球上的条件与今天的条件是迥然不同的。苏联生物化学家 Oparin 认为<sup>[17]</sup>，当时大气中没有氧，而主要成分是氢和甲烷，同时还存在较少量的氨、氮、硫化氢和水。当人们认为存在于原始地球大气中的这些物质受到紫外线、放射性、热和放电的作用后，则会产生各种各样的物质，如氰氢酸(HCN)、糖、氨基酸、肽、核苷、核苷酸及多聚磷酸盐和卟啉。

在原始地球上，由于环境中没有活的有机体使这些物质进行新陈代谢，可以想像在漫长的岁月里一定有大量物质的积累。而当大量氨基酸受热时则会形成类似蛋白质的分子，这些分子又进一步聚集成与细菌大小相似的小球<sup>[18]</sup>。至今没有一个人知道生命形式是怎样从这些聚集体形成的，而生命形式可能是在地球形成(40 至 46 亿年之前) 12 亿年之后才出现的。

这些原始的有机体也许只是利用环境中富存的这些物质就能获得它们所需要的全部能量。随着这些“活的有机体”数量的增加，这些化合物的供应最终将被耗尽。因此凡容易提供能量的物质将首先被用尽(被氧化)。生命的延续取决于那些原始的类似细菌的细胞利用尚存的难氧化的化合物的能力，这些化合物是硫化氢( $H_2S$ )和水。为此，如果能有一种利用光能的方法，那么这些“细胞”将会受到极大的帮助。于是，一个原始的光合作用系统可能进化而来，它能利用光能氧化一个电子给体，进而合成了为进一步代谢所需的高能物质。由于水是最难氧化的物质之一，因此，一个生物进行水的光合氧化的能力显示大大超过其它任何生命形式的进化上的优越



性，因为这种生物再也不需要依赖于富能物质而生存了。

用水做为电子给体而将碳还原成碳水化合物，并以废物形式释放出氧的光合作用在地球的历史中很早就发生了。化石记载表明大约 30 亿年前就出现了释放氧的蓝绿藻。蓝绿藻用水做为它们的电子给体的能力，使它们能更好地适应它们所处的环境，因此较之光合作用细菌有更大的进化优越性，而光合细菌只能生活在可以获得简单的有机化合物或硫化氢 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) 的地方。放氧光合作用成为植物主要类型的能量转换系统，并造成大气中氧的积累，最后通过氧的光化学变化而在大气的最外层形成了一层臭氧保护层。

### 13.1.2 光合作用概述

光合作用的时间范围是很宽的。吸收一个光子并产生激发态大约需  $10^{-15}$  秒，而二氧化碳固定的酶促反应和细胞的合成大约发生在几秒或几分钟内。

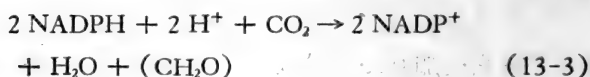
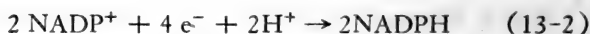
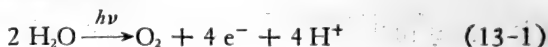
从根本上讲，绿色植物的光合作用是从水中移出电子(或氢)，并将它们加到二氧化碳上，以形成碳水化合物并释放出作为废物的氧。这是一个“爬坡”的过程，因此需要叶绿素分子所捕获的能量。

可以把光合作用最初阶段的看做一个捕获光的作用。色素分子捕获光子后处于激发态、激发的色素分子或是通过不同的途径以无用形式将能量丧失或是将能量传递给叫做反应中心的一种特殊环境下的叶绿素，而光能转变为化学能就是在反应中心进行的。在反应中心的叶绿素被激发后便放出一个电子而氧化。由反应中心放出的电子被称为原初受体的另一些化合物所接收，这些化合物便被还原。由于反应中心吸收一个光子而使一个电子跃迁到受体的较高能级的过程类似于一个水泵把水由低处抽到高处。原初受体可以把电子

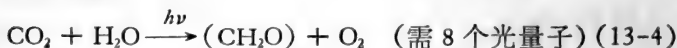
传递给次级受体。次级受体又可将电子传递给第三个受体等等依次类推，这个序列便称为电子的输运。所有这些次级电子的输运反应都是下坡的。它们沿着热力学梯度进行，正如水向低处流一样。细菌光合作用只有一个与电子输运系统相连的光转换步骤，而植物利用了两个独立的反应中心，每个反应中心都能克服热力学梯度而把电子提到较高能级。

这两个反应中心是串接在一起的，于是由一个光反应逐出的电子沿着输运链经过若干从一个载体到另一个载体的电子传递而最终到达另一个反应中心。在这个过程中，电子的能量以形成 NADPH 和 ATP 而作为化学能贮存起来，这两个产物是光合作用的高能终产物，它们在固定二氧化碳的暗反应中用来生产碳水化合物 ( $\text{CH}_2\text{O}$ )。

光合作用的总反应是：



净反应是：



此外，碳循环中糖的生成（看 13.9）需要 ATP，ATP 是在电子从水到 NADP 的输运过程中形成的。

光合作用是一个在氧化剂二氧化碳（其氧化还原电位为  $-0.4 \text{ V}$  左右）和还原剂水（其氧化还原电位约  $+0.8 \text{ V}$ ）之间的氧化还原过程，这个过程需要克服约  $1.2 \text{ V}$  的总梯度把四个  $\text{e}^-$  输运到较高的能级。因此，在光合作用中，把四个电子从水移到  $\text{CH}_2\text{O}$  所需要的能量是  $4.8 \text{ eV}$  或  $110 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $1 \text{ eV} = 23 \text{ kcal mol}^{-1}$ )。

## 13.2 植物中的光合作用色素

到达地球的光的波长范围大约是从 290 — 1100nm。不同的光合作用生物体中，有着能够在这整个波长范围内吸收光的一些色素(图 13-1)。细菌中的细菌叶绿素吸收近紫外和红外波段的辐射，而藻类和高等植物中的叶绿素 a 在此波段不具有有效吸收(图 13-1 A)。相反，叶绿素 a 的最大吸收分别在 440nm 附近的蓝区和 680nm 附近的红区。其它光合作用色素如叶绿素 b 和 c、类胡萝卜素、藻红蛋白和藻青蛋白吸收最大值位于 400 — 650nm 之间，它们将在 13.2.2 中详细讨论。

### 13.2.1 叶绿素在活体内的状态

在化学结构上，叶绿素是由四个卟啉环组成的，它们连在一起形成了一个由其中心的镁络合的扁平环(图 13-2 A)，这个四卟啉的环有一个长的几乎完全饱和的碳氢叶绿醇尾与它相连。叶绿素分子的扁平头部是水溶性的，而叶绿醇尾是脂溶性的。在活的植物里，单一分子的叶绿素 a 显然以多种状态存在。如果非常精确地测定植物的吸收光谱，叶绿素 a 的吸收带是很复杂的，并且似乎是由若干个叶绿素所组成的，每个叶绿素的吸收波长略有不同。叶绿素 a 的这些所谓类型显然是由于叶绿素与植物体中不同的蛋白质分子相结合的结果。当把叶绿素 a 从植物体中提取出来时，只能得到一种叶绿素 a 的分子。我们可以把许多工作的结果总结起来<sup>[9-12]</sup>，发现活体内可能有四种不同形式的叶绿素 a，它们的吸收最大值分别在 662nm、670nm、677nm、684nm 处。

植物制造吸收不同波长的叶绿素的能力是植物这个光化

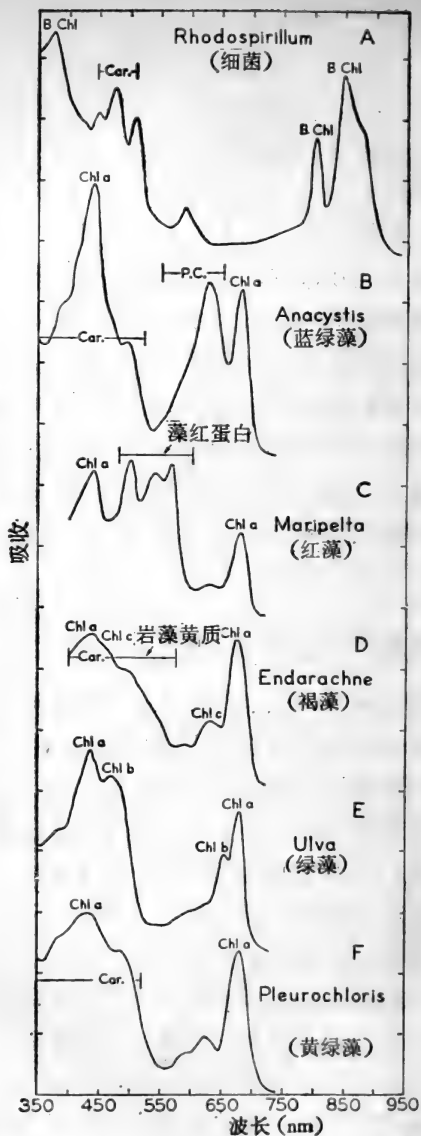


图13-1 对几种主要光合作用生物所测定的活体吸收光谱。光谱A是用不含硫的紫色细菌 *Rhodospirillum spheroides* 的载色体测定的。其它光谱是用完整生物测定的。深水红藻 *Maripelta rotata* 是生长在加利福尼亚湾海底峡谷 60m 深处。图中给出光合作用色素大致的吸收最大值，某些情况下给出吸收范围。Car. 代表类胡萝卜素，P.C. 代表藻青蛋白。

学机器的一个非常重要的特征，于是一个光子被吸收并从吸收最大值在短波的叶绿素传递到吸收最大值在长波的叶绿素（看 13.3.4）。此外，所谓辅助色素如叶绿素 b 和 c，红藻和蓝绿藻中的红藻胆色素和蓝藻胆色素以及某些类胡萝卜素都能吸收较短波长的光，并把所吸收的光传递给在较长波长上有吸收的某一类型的叶绿素 a。因此各种辅助色素和不同类型的叶绿素 a 在功能上有点像“天线”，它们为吸收波长最长的反应中心的叶绿素收集光量子，并且接受吸收波长更短的一些其它色素的大集合体所吸收并传递给它的光量子。

### 13.2.2 藻类和高等植物中色素的分布

#### 13.2.2.1 蓝绿藻

这些原始植物可能是由光合细菌进化来的，像光合细菌一样，它们的光合作用色素不在叶绿体中，这与其它藻类和高等植物是不同的。然而，它们有扁平的叫做片层或类囊体的囊状结构，这种构造布满整个细胞的细胞质。

蓝绿藻含有叶绿素 a 作为它们的主要光合作用色素。叶绿素 a 的最大吸收带在光谱红区的 680nm 附近和蓝区的 440nm 附近。图 13-1 B 给出蓝绿藻组囊藻属 (*Anacystis*) 细胞的吸收曲线。

除在所有光合植物中都存在的  $\beta$ -胡萝卜素外，蓝绿藻还含有在其它生物体内未曾发现的一种类胡萝卜素——蓝藻叶黄素。

蓝绿藻还含有吸收最大值在 626nm 附近的藻青蛋白和在 650nm 处吸收的别藻青蛋白，它们均作为第二(或辅助)色素。藻青蛋白和藻红蛋白都属于水溶性蛋白类，被称为藻胆素(属藻后胆素类)。藻青蛋白、别藻青蛋白和藻红蛋白构成了蓝绿藻和红藻的主要辅助色素，它们也存在于其它一些不

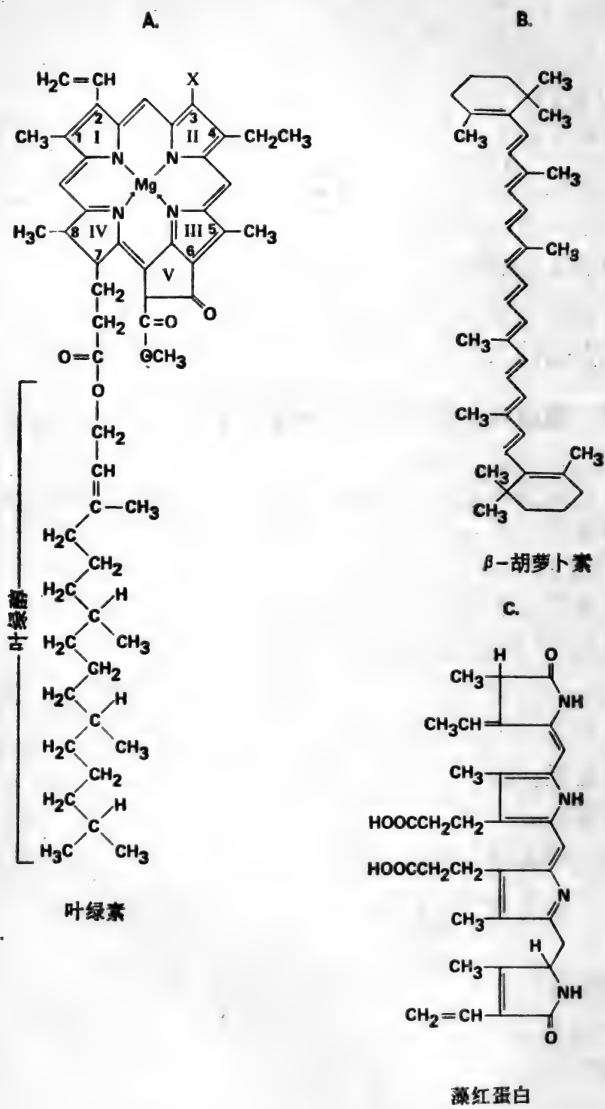


图 13-2 叶绿素 a、β-胡萝卜素和藻红蛋白的分子结构。

为人们熟知的藻类中。藻胆素的发色团是与叶绿素有关的，但是它的四个卟啉环排成一条直线(图 13-2 c)，这种排列是后胆色素的基本结构，因它们最初是从动物胆汁中分离出来的，故被称为后胆色素。这些色素适于吸收绿到橙光，而这些波长是叶绿体不能有效吸收的。

#### 13.2.2.2 红藻

这些藻类主要生活在海洋里，在深水中更容易发现它们，在那里红光和蓝光基本被上面的水层所滤掉。含有藻胆色素藻红蛋白的红藻能够吸收在深水中尚存的绿光，并用它进行有效的光合作用(参阅 13.5.1 作用光谱)。此外，红藻还含有数量不等的藻青蛋白和别藻青蛋白，生活在深水中的红藻含有的藻红蛋白比藻青蛋白要多。藻红蛋白与叶绿素 a 结合使红藻几乎能吸收可见光谱中的所有波段(图 13-1 c)。从图上我们可以看到：叶绿素 a 的吸收带在 440nm 和 678nm，500 nm，540nm 和 566nm 处的峰是由藻红蛋白的吸收产生的。除  $\beta$ -胡萝卜素外，红藻还含有  $\alpha$ -胡萝卜素，然而除了某一种绿藻 *Siphonales* 外至今所研究的其它植物中均未发现  $\alpha$ -胡萝卜素。叶黄素是红藻的主要胡萝卜素。

#### 13.2.2.3 褐藻、硅藻和双鞭甲藻

生活在海洋上层的硅藻和双鞭甲藻占了世界上光合作用的大约 33%。除了叶绿素 a 外，这些藻类还含有叶绿素 c 及特有的胡萝卜醇岩藻黄质(褐藻和硅藻)和甲藻素(双鞭甲藻)。叶绿素 c 的吸收最大值在 460nm 和 640nm 附近，而岩藻黄质和甲藻素的吸收最大值在 490nm 附近(图 13-1 D)。当它们处在天然状态下时，可能是与一个蛋白质相结合的，因此与这些色素在有机溶剂中的吸收最大值相比，岩藻黄质和

甲藻素的吸收最大值向长波长方向位移了 40nm。这些胡萝卜醇与叶绿素 c 一起使大部分绿光能用于光合作用, 否则绿光就会白白浪费掉。

#### 13.2.2.4 绿藻和高等植物

这些植物构成了日常生活中最常见的光合作用生物体。在这些植物中, 人们发现叶绿素 a 总是和叶绿素 b 同时存在的, 后者吸收最大值分别在蓝区 ( ~ 470nm) 和红区 ( ~ 650 nm) (图 13-1 E)。与蓝绿藻、硅藻和双鞭甲藻不同, 高等植物和绿藻没有可以吸收 500nm 到 600nm 之间光的特殊色素, 因此这些植物将反射这个波段, 故我们看到它们是呈绿色的。除大家都有的  $\beta$ -胡萝卜素外, 高等植物和绿藻含有叶黄素 (作为它们的主要胡萝卜醇) 和少量的紫黄质及新黄质。与岩藻黄质和甲藻素这些胡萝卜醇不同, 高等植物和绿藻的胡萝卜醇在吸收用于光合作用的光方面, 活性不是特别高的。

表 13-1 在不同植物中有光合作用活性的色素的分布

	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 c	藻红蛋白	藻青蛋白	$\beta$ -胡萝卜素	主要的叶黄素
蓝绿藻	+			+	+	+	蓝藻黄质
红藻	+			+	+	+	叶黄素
褐藻和硅藻	+		+			+	岩藻黄质
双鞭甲藻	+		+			+	甲藻素
绿藻和高等植物	+	+				+	叶黄素
黄绿藻	+					+	紫黄质



有一种藻只含叶绿素 a, 例如图 13-1F 中所示的 *Pleurochloris* (一种黄绿藻, 属 Eustigmatophyceae 类)。这个光谱清楚地表明, 吸收只是由于叶绿素 a 和类胡萝卜素所致。

植物中各种色素的分布已总结在表 13-1 中。

### 13.2.3 类胡萝卜素的功能

在所有的光合作用生物中都含有类胡萝卜素。如上所述, 一定的胡萝卜醇如岩藻黄质和甲藻素可吸收光能并将其传递到光合作用的反应中心(S)。类胡萝卜素除了作为光合作用有效光波段的吸收体外, 它还可以保护植物避免光氧化的致死效应。由于突变而失去类胡萝卜素的植物会很快被光杀死。

类胡萝卜素看来还有一些其它的功能, 在紫黄质通过中间体花药黄质转变成玉米黄质的可逆转变的反应序列中, 它可以改变叶子里胡萝卜醇紫黄质的水平<sup>[22, 23]</sup>。

## 13.3 光捕获和光化学转化

### 13.3.1 光的吸收和色素的荧光

为了进行光反应, 色素必须吸收光。当物质吸收了一个光子, 它就获得了额外的能量, 我们说它处于电子激发态。根据量子力学定律, 从基态只有通过一定的分立能态才能跃迁到激发态。并且所吸收的光子的能量必须严格地等于两个电子状态间的能量差。因此, 一定的物质只能吸收一定波长的光(参阅 2.3)。

通常, 第一激发单线态和基态的能级不会由于亚能级而出现重叠, 这不像第一激发态和更高的激发态之间有重叠的情况, 因此, 从基态到第一激发单线态的跃迁需要吸收一个

光子。同样,从第一激发单线态跃迁到基态会发射一个光子,这种光发射叫做“荧光”。荧光发射只能来自最低激发单线态,而不会来自任何较高的激发态,这是因为内转换(产生热的跃迁)很快,在  $10^{-12}$  s 内发生,而荧光发射大约需要  $10^{-9}$  s。最低激发单线态的亚能级之间也会发生小而快的内转换(能量的丧失),因此总是在比吸收光更长的波长上看到荧光。吸收高能蓝光光子而敏化的光合作用对植物来说并不比吸收低能红光光子有任何好处,这是因为吸收蓝光而产生的较高能级在较慢的光化学反应有机会发生之前已经很快降到了较低的能级。

### 13.3.2 滞后荧光<sup>[25,26]</sup>

如果植物被光照过一段时间后又放到暗处,则植物能继续发出微弱的红光。这个光只有用灵敏的光感装置才能探测到,它是 1951 年在一个实验中偶然发现的,这个实验企图用在有 ATP 存在时发光的萤火虫尾部的提取物,证明在光合作用中有光引起的 ATP 的形成(参阅 14 章)。后来,人们发现即使不加萤火虫的提取物,藻类也发红光。看来,所有的光合作用生物都能发出这种“后发光”,这种后发光叫做“滞后荧光”,以便与激发光去掉之后大约  $10^{-9}$  s 内就停止的“瞬发荧光”相区别。

这两种类型的发光具有相同的光谱分布,这表明它们都是来自叶绿素(或细菌叶绿素)。滞后荧光看来是由原初(或次级)电子受体与在反应中心通过吸收光而形成的氧化型叶绿素进行逆反应而产生的,叶绿素的这种逆还原显然使它返回到激发单线态而不是基态,从激发单线态可以发出光来。此外,滞后荧光似乎是只与光系统 II 的反应中心有关的现象(瞬发荧光也是如此)。之所以这样说是因在没有光系统 I 反

应中心 P700 的藻类突变种中仍然看到滞后荧光(关于反应中心和两个光化学系统的讨论,请参阅 13.3.5.1 和 13.5)。此外,在暗适应植物中的滞后荧光呈现出振荡,很像在给出一系列闪光时对放氧所看到的现象(在 13.6.2.3 中述及)。

### 13.3.3 能量传递<sup>[27,28]</sup>

由叶绿素分子所吸收的光量子在被反应中心捕获之前,它可以一次又一次地从一个分子传到另一个分子,很像一个台球击中另一个台球,直到它最后落入球囊为止。由“天线”分子所组成的近 400 个叶绿素分子中的任何一个为光化学捕获中心所吸收的光子很快地从一个叶绿素分子传到另一个叶绿素分子(约  $10^{-12}$  秒),最终被反应中心所捕获,整个过程只需  $10^{-9}$  秒。

可以实验证明在诸如小球藻 (*Chlorella*) 的绿藻中的能量传递,例如用波长 650nm 的光照射小球藻,此光主要是被叶绿素 b 所吸收,图 13-3 给出了叶绿素 a 和叶绿素 b 红吸收带之间的重叠。在体内叶绿素 b 的吸收最大值(650nm)比叶绿素 a 的吸收最大值(678nm)波长要短,在这种情况下只能观察到叶绿素 a 的荧光特征曲线,而测量不到任何与叶绿素 b 的荧光对应的荧光,尽管叶绿素 b 在溶液中有很强的荧光。事实上,用小球藻所做的活体研究表明,能量从叶绿素 b 传递到叶绿素 a 的效率接近百分之百。同样,藻胆色素也能以 80—90% 的效率把它们的能量传递给叶绿素。相反,从类胡萝卜素到叶绿素的能量传递效率是 20—50%,取决于所涉及的具体的类胡萝卜素。

Förster<sup>[29,30]</sup> 提出了一个了解分子之间能量传递机制的理论基础。他认为供体分子的荧光光谱和受体分子的吸收光谱之间需要有明显的重叠(图 13-3),而且能量传递速率反比于

两分子间距离的六次方。对能量从一个分子传递到另一个分子的机率为 50% 的情况,计算出两分子之间的距离应为 5nm 左右,而在叶绿体中叶绿素分子间的距离比这个距离要小的多,因此能量传递几率是非常高的。

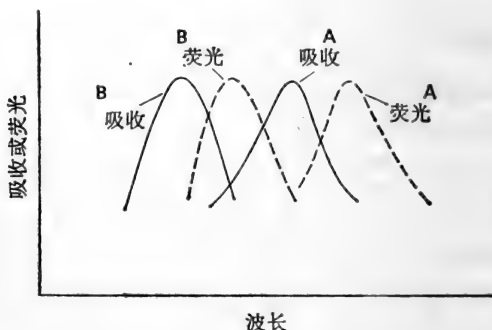


图 13-3 图示表明吸收带和荧光谱靠得很近的色素,绿藻和高等植物中叶绿素 a 和叶绿素 b 通常就是这样,因为 B 的荧光与 A 的吸收相重叠,因此很可能将 B 所吸收的光子传递给 A,这可以通过激发 B 而只观察到 A 的荧光来证明(参阅正文)。

### 13.3.4 反应中心

在光合作用器官中发生光化学反应的特定部位称为反应中心。反应中心叶绿素可以通过吸收而直接接受一个光子或通过能量传递从其它色素间接获得一个光子。吸收一个光子后,叶绿素中升到较高能态的电子可以被一个起受体作用的适当化合物所接收。电子传到受体分子的传递使受体分子还原,而叶绿素则被氧化,在“下坡”过程中叶绿素又从一个适当的给体得到一个电子时,它本身又被还原。如果受体分子的电化学位比叶绿素的激发态低的话,这个能量传递还将沿着热力学梯度(下坡)自发地进行。人们确信,在光合作用中一定有类似的情况发生。在光合作用中受体的化学特性还不

清楚。

光合细菌的反应中心可能是研究得最清楚的，因为它能以很“纯”的不附着天线细菌叶绿素的形式制备出来。从高等植物和藻类的光化学系统之一（光系统 I）中分离反应中心的工作已有进展。然而与此相反，关于这些植物的光系统 II 的反应中心，除了已观察到的光引起的吸收变化可能相当于反应中心叶绿素的氧化外，其它情况几乎是一无所知。

在由光合细菌提取出来的反应中心，可以观察到光引起从 870 nm 到 890nm 波段内吸收的减小。同样，用声波或去垢剂处理然后再进行差速离心，可以从高等植物和藻类中制备出一种小颗粒，这种小颗粒也表现出光引起的最大值在 700 nm 附近的吸收的减小。这是由库克 (kok) 发现的，他认为产生这个变化的未知物质是一种叶绿素，并把它称为色素 700 (或 P700)。

在细菌反应中心的情形以及对于 P700 来说，氧化还原电位适当的化学试剂也能产生与吸收光子相同的效应。用氰化铁和氰化亚铁混合物滴定细菌的反应中心，给出这个反应的中点电位  $E'$ ，是  $+0.5V$ 。这个氧化作用使反应中心丢失一个电子。同样，滴定 P700 可以看到它的氧化还原电位大约是  $+0.43V$ 。

### 13.3.5 光合作用单元

植物含有大量的色素，但是只有一小部分色素在光合作用的关键光化学阶段是起作用的。四十年前人们从 Emerson 和 Arnold 的实验就知道了这一点，Emerson 和 Arnold 测定了小球藻的放氧。他们用一些很短的能为叶绿素有效吸收的红色闪光。用足够强的闪光时，他们能够激发每一个叶绿素分子，也就是使光化学反应饱和。于是可以测量放出的氧与两次

闪光间的暗时间的函数关系。如果闪光之间的间隔足够长,则有充足的时间让暗反应加工光反应的产物。但是如果闪光来得太快,暗反应就会跟不上,以放氧度量的光合作用就减慢了。人们发现酶和光产物反应所需要的暗时间大约是  $10^{-2}$  s。

非常有趣的是,在实验中随着闪光强度的增加,人们发现所能得到的最高产额是一个氧分子对应吸收闪光的每 2500 个左右的叶绿素。由于产生一个氧分子需要八个光子,因此闪光产额实验证明,大约 300 个 (2500/8) 叶绿素分子合作“加工”一个光子。

计算表明,即使在阳光充足的情况下,每个叶绿素分子每秒钟也只能吸收几个光子。Emerson 和 Arnold 的实验表明,植物是怎样完美地通过 300 个叶绿素分子的集合体(称为光合作用单位)来适应这种情况,也就是说,它们全体合作将能量捕获并集中到一个特殊的进行光化学转化的叶绿素上。由于有这种天线装置来收集光能,因此使暗反应不受进行光化学转化速率的限制。

### 13.4 光合作用研究中的光谱学方法<sup>[31]</sup>

在光合作用反应中所涉及的许多物质在光谱的近紫外和可见光范围内都有吸收,同时它们的吸收光谱依它们是处于氧化态还是还原态而不同。画出的差光谱(即氧化态减还原态的光谱)表示从一个态到另一个态时吸收光谱发生的变化。图 13-4 给出了细胞色素 f 和能作为光引起的吸收变化而用光谱方法探测的其它光合作用中间产物的差光谱,它画成亮减暗的差光谱。

测量光引起的微弱而迅速的吸收变化的技术的应用为解决光合作用的难题提供了有力的手段。借助于这个技术,使

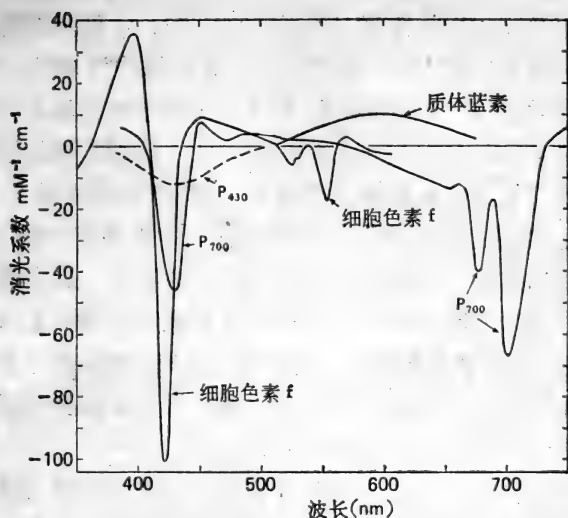


图 13-4 电子传递链上各组分 P 700, P 430, 细胞色素 f 和质体蓝素的氧化型减还原型差光谱。P 700、细胞色素 f 和质体蓝素的差光谱是光把它们从还原型转变成氧化型而产生的。负的 P 430 吸收带是由一个未确定的化合物的还原产生的(参阅正文)。

单色“测量光束”通过植物材料的样品,用适当的器件通常是光电倍增管来探测光的强度,然后用一个适当的方法如示波器或纸带式记录仪进行记录,另外还需有一个激发或作用光源。探测器的前面放置滤光片,以保证只有测量光束进入光探测器。采用适当的光源和放大器,这种装置能够测量在光合作用中涉及的许多物质中所发生的非常迅速和很小的吸收变化。

## 13.5 在藻类和高等植物光合作用中的两个光化反应

### 13.5.1 增益和双光反应<sup>[32]</sup>

作用光谱是一种度量手段,它能够揭示什么色素在敏化

某一光化学反应中起作用(参阅 1.5.4, 3.7)。例如在光合作用生物的情形, 可以画出不同波长的光放氧的效率<sup>[32]</sup>。1882 年荷兰科学家 T. Engellmann 用一个很巧妙的方法进行了这种测量, 他用的是丝状的绿藻和蓝绿藻。他把需氧的游动的细菌悬浮液加到放有藻丝的载玻片上, 再把载玻片封上, 与外界空气隔绝。用投射到显微镜载物台上的光谱照射藻丝后, 他看到在光谱的一定区域内比其它区域内聚集了更多的游动的细菌。在绿藻的情况下, 多数细菌聚集在光谱的蓝区和红区, 这里正是叶绿素吸收最大的区域(图 13-1E), 当用蓝绿藻时, 在藻青蛋白有吸收的橙光区比在叶绿素 a 本身有吸收的红光区聚集了更多的细菌(图 13-1B)。

人们用快速极谱技术监测各种色素藻类的放氧与波长的关系, 得到非常类似但是更详细的结果<sup>[33]</sup>。绿藻的放氧作用光谱所给出的结果与 Engellmann 的结果是一致的, 即由叶绿素吸收的蓝光和红光在促进放氧上是最有效的。在褐藻中, 不仅叶绿素在敏化光合作用上是有效的, 而且辅助色素如叶黄素和岩藻黄质几乎也是同样起作用的。在红藻和蓝-绿藻中发现了一个出乎意料的结果。即在促进光合作用方面辅助色素藻红蛋白和藻青蛋白的活性比叶绿素 a 本身的活性更高。在叶绿素 a 仍然吸收很强的波长上作用光谱迅速下降。对绿藻的作用光谱作更仔细的复查发现了类似的“红降”, 但这个效应不像红藻中那样地明显。在蓝-绿藻中也观察到了明显的红降。在单细胞红藻 *Porphyridium* 中可以看到荧光激发作用光谱有类似的红降。

这些作用光谱的测量结果很难和这样一个事实协调一致: 任何一个被色素吸收的光子应该和吸收的任何其它光子一样有效。Emerson 发现, 如果植物用被不同色素吸收的两个波长的光来照射, 则红降现象消失。例如, 在红藻中, 用藻



胆色素所能吸收的绿光及叶绿素所能吸收的红光同时照射,则放氧量比用两种光分别照射红藻得到的总放氧量要多。这种两个波长光的协同效应称为 Emerson 增益或者就叫增益(这个问题的综述请参阅文献 34)。

增益效应的发现是光合作用研究中的一个里程碑。在增益效应发现之前,人们认为光合作用只需要一个光反应,辅助色素只是用来关闭可见光谱范围的“光学窗”并把它们吸收的能量传递给固定光量子的一种光化学反应中心的叶绿素  $a$ 。能够得到的增益量取决于如何表示这个数值,对红藻来说,两种波长的光同时照射时产生的  $O_2$  与它们分别照射时产生的  $O_2$  的总量之比约为 1.8。

如果用适当的波长配对,在色素不同的所有藻类中都能消除红降。事实上,增益光谱(即不同波长的互补光消除红降的效率)表明,只当辅助色素与叶绿素一起激发时,光合作用才能最有效地发生。然而两种波长并不需要同时存在,两种适当的波长交替作用,间隔长达 6 秒仍可产生增益<sup>[35]</sup>。

### 13.5.2 Hill-Bendall 图

如果认为光合作用是通过两个由一系列暗的酶促步骤连接的光化学反应进行的,就能最好地解释增益现象。Hill 和 Bendall 在 1960 年对当时流行的光合作用如何进行的概念给出了一个理论框图(图 13-5),在 Hill-Bendall 模型中(有时称 Z 式图),叶子里发现的一种叫做细胞色素  $f$  的  $c$  型细胞色素被认为在两个不同类型的光化学反应中心之间起着一个中间媒介物的作用,一个反应中心(称为光系统 I)用来氧化细胞色素  $f$ ,另一个光化学反应中心(光系统 II)还原细胞色素  $f$ 。光引起的光系统 II 的反应中心的氧化最终产生一个能氧化水的强氧化剂。光系统 I 的循环将产生一个能还原固定二氧化碳

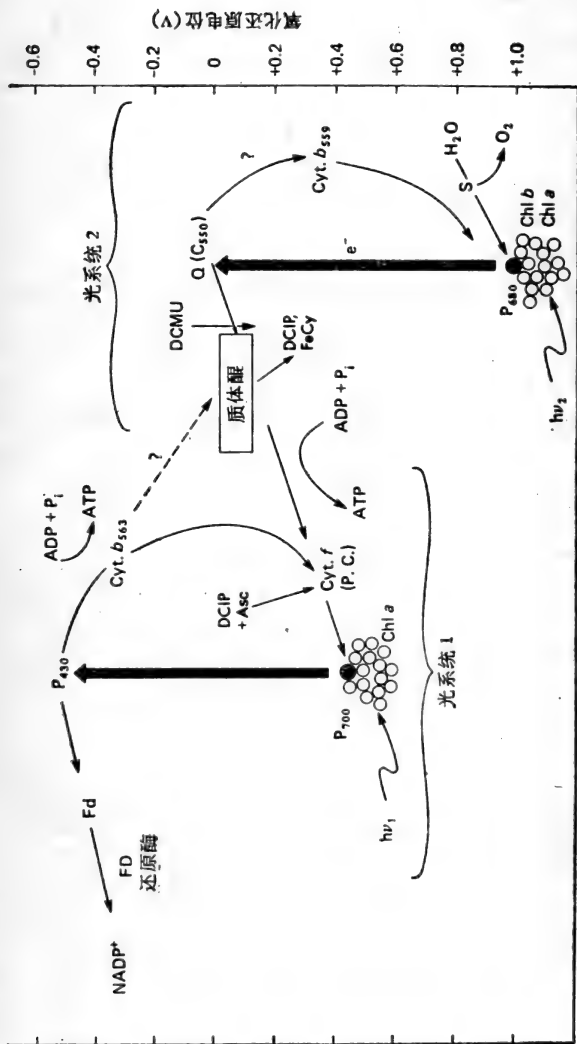


图 13-5 表示出各反应成分的氧化还原电位的光合作用 Hill-Bendall 图或 Z 式图。向上的箭头表示由于反应中心吸收了光子而使电子克服热力学梯度升到较高能级。实心圆圈代表 P700 和 P680，它们分别是光系统 I 和光系统 II 起反应中心作用的特殊叶绿素分子。反应中心周围的小圆圈代表其它形式的叶绿素和辅助色素，它们吸收较短波长的光并把能量传递给反应中心。在光系统 I 和光系统 II 中包含更多的吸收短波光色素。P430 和 C550(Q) 分别是光系统 I 和光系统 II 的原初受体。Cyt. f 代表细胞色素；PC 代表质体蓝素；FD 代表铁氧还蛋白；NADP<sup>+</sup> 代表铁氧还蛋白；NADP 代表二氧还蛋白；S 代表光系统 II 中电荷积累器(含锰的酶)；Asc 代表抗坏血酸；FeCy 代表铁氰酸盐；DCIP 代表二氯酚。两个磷酸化位置可能与电子流耦联。非循环光合磷酸化的一个位置可能在质体醌和 P700 之间的某处。循环的磷酸化位置可能与包括 P430 和细胞色素 B563 的电子传递链相耦联。

所需的 NADP 的强还原剂。

用 Hill-Bendall 模型能成功地解释的第一个实验结果如下：在红藻 *Porphyridium* 中主要由叶绿素 a 吸收的红光使细胞色素 f 氧化，而基本上由辅助色素藻红蛋白吸收的绿光(图 13-1c)使细胞色素 f 还原。不同波长光的这种相反的效应与 Hill-Bendall 模型是一致的。在蓝绿藻 *Anacystis* 中 P700 也有类似的“双光效应”，因为叶绿素所吸收的红光(图 13-1B)使 P700 氧化，而由藻胆色素所吸收的橙光使 P700 还原<sup>[38]</sup>。对其它的光合作用中间媒介物如质体醌、质体蓝素也发现了类似的相反的双光效应。实际上，观察由一个色素系统或另一个色素系统的激发所引起的推-拉效应可用来确定某化合物在光系统 I 和 II 之间电子输运中的作用地点。

### 13.5.3 两个光系统间的光分布

由于光合作用中两个光反应似乎是串联在一起工作的，因此必须均等地激发这两个光反应，从而使任一光反应不致成为速率限制反应。在植物中可能有一种机制可以调节由叶绿素分子所吸收的光最终是被光系统 I 捕获还是被光系统 II 捕获。研究<sup>[39-41]</sup>表明，如果植物用光系统 II 优先吸收的光来照射(例如，对绿藻 *Ulva* 用 650nm 光照射，图 13-1E)则存在一种对光颜色的适应，致使光量子在两个光系统之间的分配发生改变。这种重新分配的结果使得更多的光子给与光系统 I，因此增加了光系统 I 的反应，从而防止光系统 I 的反应限制了总的电子输运速率。在这种条件下，我们说植物处于“状态 2”。反之，若用光系统 I 优先吸收的光来照射植物(远红光)，则使植物进入“状态 1”。在这个状态下所吸收的光量子将更多地给与光系统 II。光量子分配的这种伸缩性对植物是非常重要的，因为即使在光的波长分布对两个光系统的平衡激发

都不利的情况下,也能使植物最有效地利用光能。

两个光系统间的光量子分配是受二价阳离子如  $Mg^{++}$  的控制的。由于已经看到光照叶绿体造成离子穿过类囊体膜的运动,所以人们认为在激发能的传递中阳离子引起的变化与光照引起的状态变化是有关的<sup>[42,44]</sup>。

## 13.6 光合作用中的电子输运和两个光化学系统

### 13.6.1 光系统 I

#### 13.6.1.1 P700

人们对造成据信在含 P700 的反应中心里存在的特殊环境的物理和化学条件知道无几。如前所述,P700 的氧化还原电位  $E'$  已经测出,大约是  $+0.43V$ 。在绿色植物和藻类中,P700 的浓度大约是 200 至 1000 个叶绿素分子中有一个 P700。细节很清楚的闪光诱导的从 250—850nm 的差光谱已被测定,它表明对菠菜在 430nm、682nm、700nm 处有负的峰。P700 在 700nm 处的差吸收系数的仔细测定结果是  $64mM^{-1}cm^{-1}$  (图 13-4)。在进行可靠的定量测定之前,必须有一个准确的吸收系数。

叶绿体的实验表明,它们能够还原堇素 (Viologen) 染料,如还原甲基堇素(其氧化还原电位为  $-0.5-0.7V$ )。

#### 13.6.1.2 P430<sup>[46,47]</sup>

短的闪光能造成吸收的减小,其峰值在 430nm 附近 (图 13-4)。根据它们不同的动力学行为可以把这些变化与 P700 所产生的变化加以区别。P430 的差光谱与 P700 的差光谱相比较,前者具有较宽的吸收带,并且在红光波段内没有吸收最

小值。由于在已研究过的所有光合作用生物中均发现了铁-硫化合物铁氧还蛋白,并且在早期的测量中发现它的氧化还原电位是  $-0.42\text{V}$  左右,因此人们认为这个泛醌类物质是作为光系统 I 的原初电子受体。光系统 I 的原初受体似乎不是可溶形式的铁氧还蛋白,因为 P700 能够还原氧化还原电位比铁氧还蛋白低的化合物。洗去可溶性的铁氧还蛋白的菠菜叶绿体仍然含有能用特征 ESR 谱检测的结合型铁氧还蛋白<sup>[48]</sup>。这种结合型铁氧还蛋白仍能在液氮温度下被还原,因此可以认为这种还原是一种原初光化学过程,因为一般的化学还原将不能在这样低的温度下进行。

P430 的差光谱(图 13-4)的形状不同于铁-硫蛋白即铁氧还蛋白。这个原初电子受体可能是由一个包含结合型铁氧还蛋白和一些未知的物质复合物组成,这种复合物可能具有比可溶性铁氧还蛋白更低的氧化还原电位。

光诱导的结合型铁氧还蛋白和 P700 的反应可以在低温(低于  $150\text{K}$ )下发生,在各种条件下,能被氧化的 P700 和被还原的铁氧还蛋白之间存在着一定的化学计量关系<sup>[49]</sup>。

### 13.6.1.3 铁氧还蛋白和黄素蛋白(铁氧还蛋白-NADP-氧化还原酶)

铁氧还蛋白是非血红素铁-硫蛋白(含有一个铁和硫的蛋白质,但又不是血红素)族的成员,至今所研究的所有生物中,从厌氧细菌到植物和动物中均发现了铁氧还蛋白。这些蛋白质在许多不同类型的反应中作为电子传递剂<sup>[50]</sup>。

植物的铁氧还蛋白的分子量较低,约 12000,它是由一条酸性氨基酸百分含量较高的多肽链组成。植物和细菌的铁氧还蛋白在氨基酸顺序上有许多相似之处,这说明高等植物和光合细菌的共同祖先曾经是一种厌氧菌,例如今天还存在的

梭菌属。

NADP 的还原,即光合作用电子输运的最后一步,需要还原的铁氧还蛋白和叫做铁氧还蛋白-NADP-氧化还原酶的一种黄素蛋白酶,这个黄素蛋白已从菠菜中分离出来并制成了结晶。

#### 13.6.1.4 细胞色素 f 和质体蓝素

由于这两个电子输运成分似乎能迅速地与 P700 反应,所以我们就武断地把它们放在光系统 I 里来讨论。因为它们能被光系统 I 氧化和被光系统 II 还原,所以它们的功能似乎是光系统 I 和光系统 II 之间的中间电子载体。如 13.5.3 所讨论的,光系统 I 和光系统 II 的激发对细胞色素 f 的氧化还原状态的相反效应正是作为 Hill-Bendall 光合作用图式的第一个实验证明。对细胞色素 f 可以很容易看到光引起的氧化还原变化的光谱学证据,但是光引起的质体蓝素的氧化还原变化却比较难于探测,这是因为质体蓝素的氧化型还原型的激发系数太低,在 597nm 处大约为  $10\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (图 13-4),此值大约只有细胞色素 f  $\alpha$  带的激发系数的一半。因此使活体内质体蓝素氧化还原变化的探测比细胞色素 f 要困难得多。

质体蓝素是一个酸性蛋白,每个分子含两个铜原子,质体蓝素中的铜占叶绿体总含铜量的 50%。这种蛋白质首先在绿藻小球藻中被发现,随后在各种植物包括蓝绿藻中也被发现(虽然形式稍有不同)。然而在某些黄绿藻中显然是没有质体蓝素的。

加入质体蓝素能够恢复光系统 I 中部分电子输运能力的研究和用突变种和 ESR 波谱的研究表明: 质体蓝素是作为 P700 进行原初反应的配偶。另一种研究是用比较温和的方法把质体蓝素从叶绿体颗粒中洗脱,而留下细胞色素 f,它表

明细胞色素 f 的功能和在完整的叶绿体中一样迅速,因而证明细胞色素 f 是用来作为 P700 的原初给体。细胞色素 f 和质体蓝素在功能上是类似的,两者均可被光系统 II 还原,并且都能与 P700 直接反应。但要明确地解决这些相互矛盾的结果尚有待进一步的研究。

### 13.6.1.5 细胞色素 $b_{563}$

高等植物的叶绿体中除了有细胞色素 f 外,还有细胞色素  $b_{563}$ 。这个色素由光引起的氧化和还原是可以作为它在 563 nm 的  $\alpha$  波段的变化而加以探测,并且在适当条件下可以与 554nm 上出现的细胞色素 f 的  $\alpha$  带相区别。细胞色素  $b_{563}$  的氧化还原电位大约是一 0.06V,它可被光系统 I 还原,并且能调节光系统 I 周围的循环电子流(图 13-5)。

即使来自光系统 II 的电子流被堵塞时(加入 DCMU; 参阅 13.6.2.2)或光系统 II 被破坏时,  $\text{NADP}^+$  仍然有可能被光系统 I 还原。在这种情况下,诸如被抗坏血酸还原的 2,6-二氯酚 (DCIP)、二氨基四甲苯基 (DAD) 或 N-四甲基-P-苯二胺 (TMPD) 等电子给体也能在沿着光系统 II 以后的传输顺序的各个点上“供给”电子(图 13-5)。

## 13.6.2 光系统II<sup>[51]</sup>

如果说对光系统 I 的各个成分之间的相互作用和详细的功能了解的不多,那么对光系统 II 的功能了解的就更少了。

人们作了相当大的努力去寻找一种特殊的叶绿素,它类似 P700 在光系统 I 里的功能,起着反应中心的作用。已观察到在 680nm 附近有一个可逆的光诱导的吸收的减少 ( $\text{P680}$ )<sup>[52]</sup>, 它和 P700 类似,可能与一个特殊的叶绿素成分的漂白(氧化)相对应。因为在光系统 II 浓集的亚叶绿体颗粒中

这个变化特别大,因此这个变化可能反映了光系统 II 反应中心叶绿素的功能。由于给放在  $-196^{\circ}\text{C}$  下的样品一个 20 ns 的红宝石激光脉冲后 680nm 处的吸收减少,并且 P680 暗恢复(还原)与 b 型细胞色素(由于它的氧化型减还原型的  $\alpha$  谱带中最小值的位置而得名细胞色素  $b_{559}$ ) 的氧化作用相耦联,所以人们认为 P680 的功能类似于 P700<sup>[53]</sup>,是光系统 II 的光合作用反应中心。在浓集了光系统 II 的亚叶绿体颗粒中测量 680nm 附近吸收的变化特别困难,这是因为叶绿素 a 的荧光最大值在这个波段内,因此干扰了吸收变化的测量。

### 13.6.2.1 Q 和 C550<sup>[48]</sup>

曾假定存在一个作为猝灭剂的物质“Q”,并且是光系统 II 的原初电子受体<sup>[54]</sup>,即使在液氮温度下也能出现的荧光强度的变化反映了这个物质的存在。当 Q 被氧化时,荧光较低(被猝灭),这是因为由光系统 II 吸收的光被用来还原原初受体,而不是以荧光的形式被浪费掉。而还原型 Q 的积累可使荧光增强,因为 Q 再也不能从反应中心接受激发能了。Q 的浓度大约是每 400 个叶绿素分子有一个 Q 分子。

在菠菜叶绿体中发现: 550nm 处有一个新的可逆的光引起的吸收率减少<sup>[55]</sup>,并发现那是由光系统 II 的激发产生的,这个变化与光还原作用有关,在液氮温度下(77K)仍能看到。因此这个变化被认为是由光系统 II 的原初受体所产生的。

已经进行了一些研究以了解 Q 和 C550 是否都反映的是同一化合物的活性<sup>[56]</sup>。氧化还原滴定表明两种物质(Q、C550)具有同样的中点电位和相同的滴定曲线。缺少 Q 的藻类突变体同样也缺少 C550<sup>[57]</sup>。最近的结果认为, C550 吸收的变化是由于光诱导的一个化合物的吸收最大值从 546nm 蓝移至 544nm 所产生的,并非是由氧化还原反应引起的吸收变化所



产生的<sup>[58]</sup>。用己烷提取冻干的叶绿体使本应在低温下看到的C550吸收的变化不见了,而向提取物中加入 $\beta$ -胡萝卜素则又恢复了这个变化。在一定的条件下,C550吸收的变化是可以被抑制的,然而由光系统 II 所驱动的光化学反应如DCIP的还原仍能继续进行<sup>[59]</sup>。根据这些结果可以认为 C550 是一个类胡萝卜素-蛋白质复合物,并不是光系统 II 的真正的原初受体,它可能是实际上进行可逆的氧化还原反应的另一个物质的“指示剂”。

### 13.6.2.2 质体醌

质体醌和  $\alpha$ -生育酚-醌及维生素 K<sub>1</sub> (萘醌) 都是叶绿体中最丰富的电子载体。像脂一样,这些化合物可溶于碳氢化合物,而不溶于水。在植物中某些醌以小球状存在,这种状态下的醌在光合作用中可能是不活泼的。大约每 40 个叶绿素分子有一个质体醌,因此质体醌的浓度比 Q、细胞色素 f 或 P700 高 10 倍左右,质体醌在光合作用中起重要作用,这是由于它显然可做为一个大的电子库以储存光系统 II 氧化水所产生的电子。它的功能可以用它还原时引起的 254nm 附近吸收的减小来监测。这种测量表明,质体醌可被光系统 II 还原,被光系统 I 氧化。光系统 I 氧化还原型质体醌的速度是比较慢的,大约需  $10^{-2}$  秒,这与 Emerson 和 Arnold 发现的为了得到最大放氧量闪光之间所需要的暗时间是一样的,由此看来决定光合作用速度的反应似乎是质体醌的氧化。除草剂 DCMU [(3-3,4-二氯酚)-1,1-二甲基脲]能阻断质体醌的还原。在有 DCMU 存在时所看到的荧光的增强看来代表了还原型 Q 的积累,这说明 DCMU 在 Q 的氧化和质体醌的还原之间的某一(或某些)步骤上影响了电子的输运。

如果把 DCIP 或铁氰化物加到叶绿体中,它们可起受体

作用而被光系统 II 的激发所产生的电子还原。这种还原在它的发现者 Robin Hill 死后一直叫做 Hill 反应。

### 13.6.2.3 放氧

为了放出一个氧分子,必须从两个水分子中取出 4 个电子。因为吸收一个光量子只产生一个自由电子,因此必须把四次光反应的结果加在一起才能发生一次放氧。很早就已知道,给完全暗适应的藻类一个很短的闪光不产生任何放氧。最近 Joliot<sup>[60]</sup> 和 Kok<sup>[61]</sup> 等人提供了有关光合作用放氧机制的新的重要的资料。在他们的实验中用了非常灵敏的极谱技术,研究氧从暗适应藻类里的释放,暗适应了藻类用一系列连续的其强度足以激发每个反应中心的短闪光来照射。在放置暗中足够长时间的藻中,第一个闪光不产生任何放氧,第二个闪光只产生很少量的氧,而第三个闪光产生氧的量最多,第四个闪光产生的放氧又减少一些(图 13-6)。以后即以这样的顺序继续下去:前两个闪光的放氧产额低,后两个闪光给出的产额高。有趣的是,除第一个放氧峰值是在第三次闪光之后,都是每四次闪光之后出现一个  $O_2$  产额最高的峰值。因此, Kok 等人提出了一个模型<sup>[61]</sup>,按照这个模型,有一个酶“S”接连不断地累积来自光系统 II 反应中心的四个正电荷。这个处于完全氧化状态的酶( $S^{+4}$ )氧化水而放出一个氧分子,同时使系统回到失去正电荷的状态(图 13-6)。这个酶的中间氧化态  $S^{+2}$  和  $S^{+3}$  是不稳定的,在黑暗中将衰变成稳定的  $S^+$  态。因此,在暗适应的藻类中,给三次闪光氧的释放量最大,继续闪光,则得到最大氧的释放量的周期数为四。这个周期就像以四为周期的阻尼振荡一样继续下去。

Kok 的模型对解释放氧的机制提供了一个很有用的基础。但我们至今仍不了解作为光系统 II 电荷累积器的物质的

生物化学性质。然而大家都知道放氧系统是很不稳定的, 50℃ 加热数分钟, 或用 Tris 缓冲液洗涤, 或用紫外线照射, 该体系很快便被破坏了。Cheniac<sup>[62]</sup> 指出锰在氧的释放中起重要作用, 每400个叶绿素分子有六个锰原子。六个锰原子中的四个很容易被提取出来, 而导致了放氧量的下降, 下降的数量正比于这种容易去除的锰原子丢失的分数。这四个锰原子与可能有调节放氧功能的蛋白质相结合。

如果放氧系统被钝化, 如用 Tris 缓冲液洗涤或用温热处理, 那么通常由水的氧化而产生的电子可通过加入其它的化合物而提供, 这些化合物如二苯基碳酸酰肼、苯二胺、羟胺或联苯胺。

#### 13.6.2.4 细胞色素 $b_{559}$

人们已经观察到细胞色素  $b_{559}$  可以发生由光系统 II 调节的低温氧化。细胞色素  $b_{559}$  的氧化伴随着 C550 的还原。但是细胞色素  $b_{559}$  不是光系统 II 的原初电子给体, 因为在冷冻前, 这个细胞色素可以被化学氧化, 比如加入铁氰化钾使它氧化。然后在低温下, 虽然细胞色素  $b_{559}$  已被氧化, 仍可看到 C550 发生变化。

用温和的方法从菠菜叶绿体中制备的基粒样品(即片层堆积, 参阅 13.8.2) 进行实验, 看到光诱导的细胞色素  $b_{559}$  的氧化是受光系统 II 调节的。这种细胞色素的功能之一像一个安全阀的作用可以调节围绕光系统 II 的循环电子流(图 13-5)。如果由于某种原因光合作用电子流中断了, 那么围绕光系统 II 的循环电子流通过阻止由光系统 II 形成的强光氧化等效物的积累而使光化学系统免受损伤。

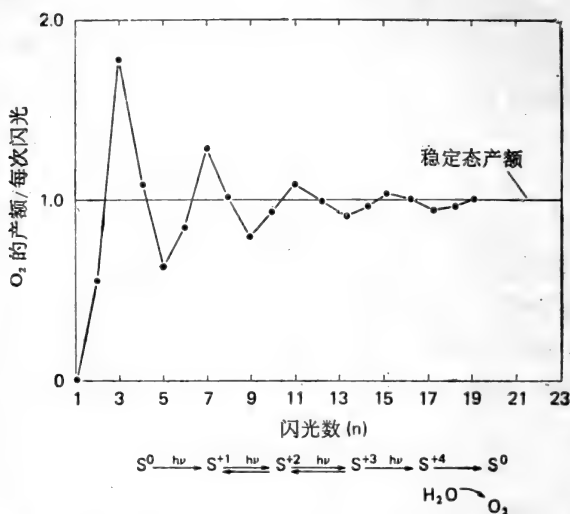


图 13-6 在暗适应的菠菜叶绿体中，与稳态产额相比较，每次闪光氧的相对产额(引自参考文献 60)。

## 13.7 光合磷酸化作用<sup>[63,64]</sup>

### 13.7.1 不循环的和循环的光合磷酸化作用

随着 NADPH 的形成和 ATP 的产生，光反应和与光反应偶联的电子运输的任务也就完成了。为了使二氧化碳进行还原反应以形成碳水化合物，需要 NADPH 和 ATP。我们已经看到电子运输的最终结果是如何形成 NADPH 的，但是这个传递过程还产生了 ATP。ATP 的形成与电子向 NADP 的单向运输的偶联叫做“不循环的”光合磷酸化。另外，人们也看到，当把腺苷二磷酸和无机磷酸盐 (Pi) 加入含有叶绿体或色素细胞的反应混合物中时，ATP 是光照生成的唯一产物。这个过程叫做“循环的光合磷酸化”。

磷酸化的亮阶段和暗阶段可以分开<sup>[65]</sup>。先用光照射叶绿体,然后把叶绿体放入保存于暗处的含有 ADP、Pi 和  $Mg^{++}$  的溶液中,这样仍可能有些 ATP 形成。这类实验说明,光照之下形成了某些物质,其寿命有几秒钟,正是这些物质导致了 ATP 的暗形成。

### 13.7.2 高能中间产物和化学渗透假说<sup>[66]</sup>

有两种观点去解释循环的和非循环的电子流出现时 ATP 高能磷酸键中的能量守恒问题。一种观点认为,在电子流动过程中形成了某种假设物质的“高能态”。这种假设物质进行着氧化和还原两种反应,同时进行着水化和脱水两种反应。到目前为止这个概念一直不很成功,因为始终没有找到一种化合物能起这种双重作用。

Mitchell 提出了一种“化学渗透”假说<sup>[67,68]</sup>,这个假说认为,由于光反应和电子运输的结果在光合作用膜(类囊体膜)两边产生的电化学电位引起了  $H^+$  从膜外向膜内的运动。类囊体膜内侧较高的氢离子浓度有利于 ADP 和 Pi 的酶促脱水以形成 ATP 和水。用这个化学渗透假说可以解释磷酸化作用亮阶段和暗阶段,因为光反应在膜内逆着热力学梯度产生较高的氢离子浓度。在暗处,这些  $H^+$  将会溢出膜外,溢出时通过偶联过程生成 ATP。许多其它的实验结果都支持了 Mitchell 的假设,例如人们都知道,为了形成 ATP,必须有一个使内部空间和外部空间隔开的膜,只有这样才能得到离子浓度差,由于这种离子的运输产生的水的运动将引起叶绿体体积的改变,而这个改变可以通过光散射的明显改变探测出来。很有趣的是,光照的叶绿体引起它周围介质的 pH 值的升高,这大概是由于光照的叶绿体摄取  $H^+$  的缘故。这个  $H^+$  的消失是可逆的,当叶绿体被放于暗处时, pH 又降低了( $H^+$  从叶绿体

中跑出来了)。更有趣和对 Mitchell 假说支持更有力的是一些这样的实验<sup>[69,70]</sup>, 这些实验表明: 在黑暗中把叶绿体浸泡在 pH 4 的介质中可以代替光的作用, 因为这样处理也可以使叶绿体内部的  $H^+$  浓度增加。在 ADP 和  $P_i$  存在时, 如果把 pH 值提高到 8 左右, 可产生 ATP。

图 13-7 表示人们所认为的按照化学渗透假说发生的各个事件的顺序。水分解系统处在类囊体的内表面上, 光系统 II 从水中每取出一个电子就放出一个质子。Q(C550) 被光系统 II 还原最终导致质体醌的还原。为了还原质体醌, 需要加上一个从膜外摄取的质子, 而质体醌的氧化只要通过电子传递反应取走一个电子就能实现。质体醌释放的质子优先扩散到膜的内部。当两个  $H^+$  在膜内表面上与 ADP 和无机磷脱水生成 ATP 时形成的等效  $O^{2-}$  (可能和酶结合的?) 结合时就形成了 ATP, ADP 和无机磷的脱水作用是由一个 ATP 酶调节的。在形成  $O^{2-}$  的同时还释放出两个  $H^+$ , 这两个  $H^+$  被排到膜的外部空间。  $O^{2-}$  的极性向膜内而两个  $H^+$  的极性向膜外完全是化学渗透假说任意假定的。

Mitchell 的看法解释了电子传递似乎是与磷酸化作用相偶联的实验观察, 所谓偶联是指磷酸化作用中电子的传递速率受 ATP 的形成速率控制。

如果磷酸化作用是“解偶联的”, 那么电子输运就能以更快的速率进行。使磷酸化与电子输运解联有点像把负载从发动机上御掉, 从而使它转动的更自由。许多不同类型的物质都可以起解联剂的作用。而所有这些物质的解联效率看来取决于它们消除膜两边所产生的电化学位的能力。氨或一个氨基(如甲胺)之所以有解联作用, 显然是由于这些化合物能够自由地扩散通过膜并与类囊体内部空间的  $H^+$  结合形成  $NH_4^+$  或氨的阳离子。

有一些类似抗菌素的化合物,叫做离子载体,它们起着转移离子的作用。最近做了许多关于这些物质对与 ATP 形成有关的离子运动和膜电位的影响的研究<sup>[71,72]</sup>。

尼日利亚抗菌素能将  $H^+$  换成  $K^+$  或其它碱金属离子,反之亦然,因此它只影响磷酸化作用而不减少由于内外空间的离子浓度不等而在膜两边建立的电荷。另一种抗菌素短杆菌肽显然是在膜上打“孔”,从而使膜内外的  $H^+$  可以自由扩散,于是扰乱了膜两边的电荷以及磷酸化作用。缬氨霉素使膜能透过  $K^+$  或  $NH_4^+$  离子,而不能透过  $H^+$ ,于是膜电位或是形成或是消失,这将依赖于电子流的方向。

虽然本节强调了 Mitchell 的假说,但是还有一些别的观

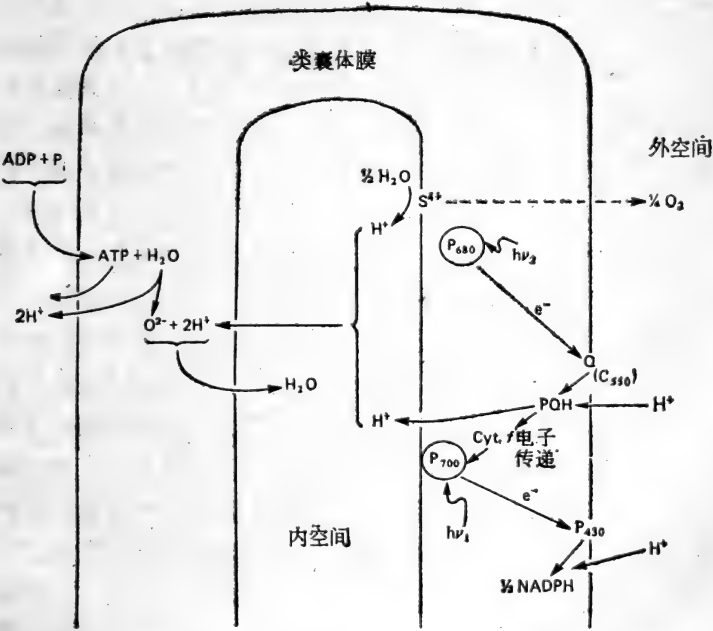


图 13-7 根据 Mitchell 的化学渗透假说来解释光合作用膜中电子的传递是如何与质子的摄取和磷酸化作用相联系的模型(详见正文)。

点解释离子输运与电子流和光合磷酸化的关系,它们由 Dilley 做了评述<sup>[71]</sup>。

### 13.7.3 色素的电化学变化和吸收位移

迄今为止讨论过的光诱导的吸收变化,可能除 C550 外,都是由反应中心叶绿素分子 P700 或 P680 的氧化还原反应或是由像细胞色素、质体蓝素、质体醌等氧化还原载体所产生的。但是,还存在着另外一些光合作用色素吸收的变化,这些吸收的变化与氧化还原变化无关,但是却与光合膜的能量状态有关。

一般认为由于过量的  $H^+$  或其它离子的累积在膜两边形成了电位,这个电位看来使大多数叶绿素和类胡萝卜素的吸收最大值产生光诱导的位移。通常所看到的是吸收最大值向长波方向有一个小的位移,而在暗处吸收最大又回到原来的位置。例如,具有彼此分开约 30nm 的三个峰值的类胡萝卜素的吸收光谱向长波的位移将产生一个特征的差异光谱,此差异光谱具有三个负峰和三个正峰,每个峰值相差约 30nm。在许多光合作用生物中都观察到了与这些特征很类似的差异光谱。在某些光合细菌和高等植物中,这种差异光谱看得特别清楚(图 13-8)。光照时,大多数叶绿素和类胡萝卜素看来都表现出光诱导的吸收最大值的位移。在绿藻和高等植物中,在 510—518nm 区间可以看到较大的光诱导的吸收增加,这个吸收的增加与 475nm 附近的负峰是动力学上相关的(图 13-8B)。特别在最近几年,这个吸收的变化一直是许多研究工作的课题。它显然是由类胡萝卜素和叶绿素 b 的吸收位移所产生的,而且显然发生在 20 ns 内。人们认为<sup>[72]</sup>,光产生了一个横跨类囊体膜的电场,这个电场引起了大多数叶绿素和类胡萝卜素吸收峰位置的电色谱位移。在连续光照的情



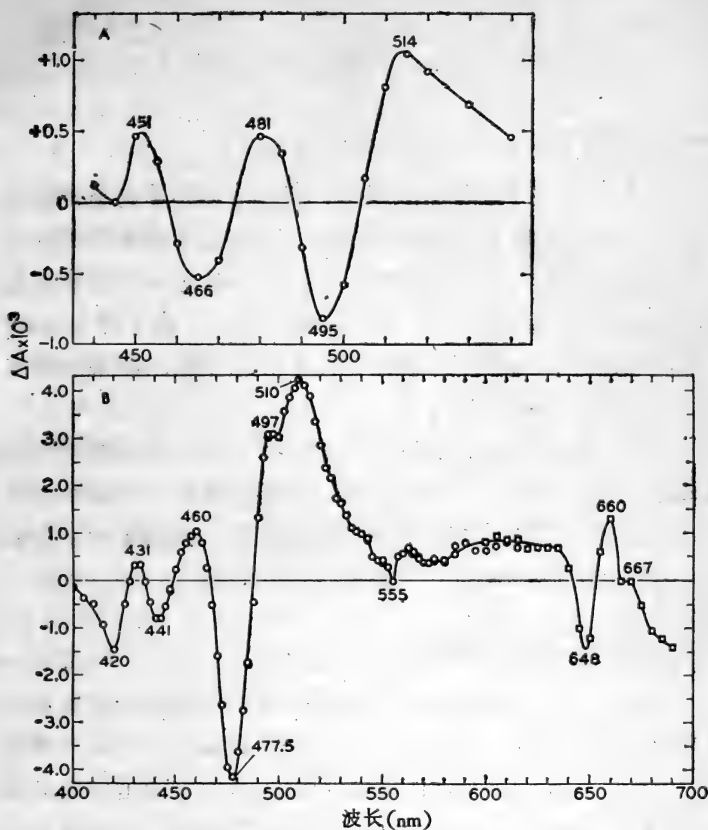


图 13-8 A. 红藻 (*Iridaea*) 所产生的光诱导吸收的变化<sup>[73]</sup>;  
 B. 红化光在绿藻中产生的光诱导吸收的变化<sup>[74]</sup>。在 420nm、  
 555nm 处的极小值是由细胞色素 f 所产生的。其他峰值可能是由  
 于光诱导的类胡萝卜素、叶绿素 a 和 b 的吸收位移所产生的。

况下，这些位移能够持续存在并表现出复杂的动力学，它们可能是在产生了膜电位的基础上由两个光反应的相互作用造成的。人们一直有一种看法<sup>[76]</sup>，认为 515nm 吸收位移是光合磷酸化驱动力的指示剂。

## 13.8 光合作用的结构组织<sup>[77]</sup>

### 13.8.1 叶绿体

除光合作用细菌和蓝绿藻外,高等植物和其它藻类都有它们的光合作用器官,这种光合作用器官位于叫做叶绿体的一定的结构之中。由于植物的种属不同,叶绿体的形状也是各式各样。其形状从小球藻中的杯状结构,到水绵(*Spirogyra*)中的螺旋体或其它藻类中的星状体结构。菠菜叶绿体是半径约  $5-7\mu\text{m}$  的扁平球。

叶绿体被连续的双层膜所包围,外层膜与内质网相连。显然双层膜的内层是不与细胞的其它膜相连的,但是被叶绿体内形成的大量片层系统所缠绕。这个双层膜起着对一个对进出叶绿体的代谢物质进行选择的屏障的作用。

### 13.8.2 片层、基粒和基质

复杂的片层结构排列(或类囊体)是高等植物叶绿体的一个特殊的内在特征。片层之间经常是彼此紧密相叠而形成基粒,很像一叠饼。片层的一部分可以从基粒堆中延伸到周围空间,称为基质。它是由类蛋白质的间质所组成。光反应和偶联的电子输运均处于片层和基粒的结构中。光反应的产物 ATP, NADPH 从这些构造中扩散到有固定  $\text{CO}_2$  的酶存在的基质中。

具有或失去周围双层膜的叶绿体均能制备。具有完整周围膜的第一类叶绿体保留了它们的可溶性的基质成分,而能以很高的速率固定  $\text{CO}_2$ 。但是失去周围膜的第二类叶绿体由于其基质中丢失了可溶性的成分,若要固定  $\text{CO}_2$  必须重新加入这些失去的成分。

基质还含有与叶绿体的调节和复制有关的核糖体和DNA。在基质区域往往还看到一些淀粉颗粒,它们是含有亲脂性叶绿体醌如质体醌、维生素K<sub>1</sub>及 $\alpha$ -生育酚或 $\alpha$ -生育醌的小球。这些小球在光合作用中不起直接的作用,但可作为这些物质的储存库。

因为几乎在所有的高等植物叶绿体中均发现了基粒堆,因此它们很可能在光合作用中起着某些重要的作用。但是我们现在仍然不知是什么导致了基粒堆的形成,以及为什么缺乏基粒的叶绿体具有在含有基粒的叶绿体中迄今所测到的全部光化学活性。例如红藻,它没有基粒堆,只有未堆砌的片层遍布于叶绿体,但它能进行完全的光合作用,包括放氧。比较光化学活性的研究表明,光系统I在叶绿体片层的发育中出现的较早,而光系统II活性的出现似乎与较晚形成的基粒有关。

高等植物如菠菜叶绿体的基粒和基质片层可通过机械破碎叶绿体而将其彼此分开。差速离心可给出几乎只含有纯基粒的密度大的部分和由基粒间片层(基质片层)所组成的密度较小的部分。基粒间的片层有较高的叶绿素a与叶绿素b的比率(大约5—6),有很低的荧光和高浓度的P700,这部分不能放氧或显示与光系统II有关的其它反应。

与只含光系统I的密度较小的基粒间片层不同,密度较大的基粒部分似乎既含光系统I又含光系统II。这部分有较低的叶绿素a与叶绿素b比率(2.5),具有较强的荧光,能放氧,并含有细胞色素b<sub>559</sub>和P680。

### 13.8.3 基粒叶绿体和非基粒叶绿体

为了固定CO<sub>2</sub>而具有所谓C4-二羧酸途径的某些植物有不同类型的叶绿体,这是由于它们在植物体中的部位不同而决定的。在C4植物如玉米的叶子中,脉管束周围的细胞几乎

不含基粒而只含基质片层，而在叶肉部分的叶绿体却含有丰富的基粒和基质片层。最初人们曾认为，从脉管束得到不含任何基粒的叶绿体将没有光系统 II 的活性，照此可类推菠菜的基粒间片层也没有光系统 II 的活性，同时人们还认为，玉米的叶肉叶绿体既含光系统 I 又含光系统 II。现在大量证据表明，无基粒维管束叶鞘叶绿体的确具有很高的光系统 I 的活性，缺乏一些光系统 II，可能只有在叶肉叶绿体中看到的光系统 II 活性的 40%。这些结果说明在基粒堆积程度与光系统 II 的活性水平之间不能直接联系起来。

目前大量的工作是致力于叶绿体结构与功能的研究。这些研究除了采用光学显微镜和电子显微镜外，还采用了偏振显微镜、X 光衍射、去垢剂或声波或压敏元件等物理方法来破碎叶绿体，以及大分子的定位标记、免疫化学等技术。

## 13.9 二氧化碳的固定

### 13.9.1 Calvin-Benson 循环或 C3 碳循环<sup>[79]</sup>

CO<sub>2</sub> 的固定需要由光合作用的光反应生成的 ATP 和 NADPH，同时还要通过一系列的暗反应。一般说来，CO<sub>2</sub> 的固定有两种主要型式——C3 和 C4 途径。

C3 途径也叫 Calvin-Benson 循环，是以发现者命名的。Melvin Calvin 曾于 1961 年因阐明了光合作用中碳的途径而获得诺贝尔化学奖金。C3 途径的基本反应是 CO<sub>2</sub> 加成到 5-碳糖核酮糖二磷酸盐上 (RuDP) 而形成两个磷酸甘油酸 (PGA) 分子。与 ATP 同时的 NADPH 的还原能力被用来把磷酸甘油酸 (PGA) 中的酸基变成 3-碳糖磷酸甘油醛 (磷酸丙糖) 中的醛基。随着 3-碳糖的形成使光合作用的能量储存了起来。Calvin-Benson 循环的另外几步是通过一系列涉及

3-、4-、5-、6-、7-碳糖磷酸盐的复杂反应重新产生出  $\text{CO}_2$  的最初受体(RuDP)。虽然,光合作用的最终产物是糖和碳水化合物,但是也形成了其它化合物。例如脂肪、脂肪酸、氨基酸,有机酸也是在光合作用  $\text{CO}_2$  的固定中被合成的。这些物质的形成似乎部分受环境因素如光强度、 $\text{CO}_2$  和  $\text{O}_2$  浓度的控制。搞清楚这些因素怎样相互作用,就有可能控制生长条件以培养出具有理想的糖、脂肪或蛋白质含量的植物。

### 13.9.2. C4 循环<sup>[80,81]</sup>

广泛散布于植物界的许多植物都能在严热而干旱的环境中茁壮成长。在这些植物中  $\text{CO}_2$  的初始固定不是通过像在 Calvin-Benson 循环里那样与 RuDP 的缩合作用,而是通过一个叫做 C4 循环的中间循环。在 C4 循环中  $\text{CO}_2$  首先与一个 3-碳酸即磷酸烯醇丙酮酸(PEP)结合形成两个 4-碳酸-苹果酸和天门冬氨酸(图 13-9)。进行这些反应要经过中间产物 4-碳的草酰乙酸,并且要由 PEP 羧化酶来催化。4-碳酸苹果酸和天门冬氨酸只有当它们脱掉羧基(失去以前固定的  $\text{CO}_2$ )生成 3-碳丙酮酸时,才能转化成糖。通过与光合作用形成的 ATP 进行反应,丙酮酸又转变成 PEP, PEP 可再次接受一个  $\text{CO}_2$  分子。这个循环主要完成的是从植物体外部吸收  $\text{CO}_2$  并把它释放到植物体内部。一旦进入植物体内部,释放的  $\text{CO}_2$  就按通常的方式通过 Calvin-Benson 循环与 RuDP 反应。这个循环可能看起来对植物用处不大,特别是考虑到必须用额外的 ATP 来开动这个“ $\text{CO}_2$  泵”。具有 C3 循环的植物需要 3 个 ATP 和 2 个 NADPH 分子,而 C4 植物需要 4 个分子的 ATP 和 2 个分子的 NADPH。正如 13.8.3 所述, C4 植物具有特征的解剖学构造和两种类型相当不同的叶绿体。在这些植物中,脉管束被一些含有叶绿体的束鞘细胞所紧紧包围着,

我们能够把束鞘细胞从它们外围的叶肉细胞里区别出来(图13-9)。

C4植物的CO<sub>2</sub>泵似乎位于叶肉细胞中,其功能是有效地捕获从叶子表皮的呼吸孔扩散进来的CO<sub>2</sub>。这样捕获的CO<sub>2</sub>然后被释放到束鞘细胞内,在那儿通过 Calvin-Benson 循环而被固定。CO<sub>2</sub>泵能有效地使叶肉细胞内的游离CO<sub>2</sub>维持在较低的浓度从而使CO<sub>2</sub>能从以300ppm(0.03%)左右的浓度存在的大气扩散进入叶子内部,即使气孔可能是几乎关闭的情况也能这样。植物即使在气孔部分关闭的情况下也可获得CO<sub>2</sub>的能力意味着损失的水分少,这对植物在干热气候下的活存是一个很重要的条件。因此植物消耗额外的ATP去开动CO<sub>2</sub>泵看来是值得的,因为这能使植物收集足够的CO<sub>2</sub>而又在过程中不损失大量的水。总之,这个额外的ATP很容易通过循环的光合磷酸化作用而得到,因为生活在干旱地区的植物往往能得到充足的阳光。

C4植物能在干旱地区生长并进行光合作用的能力对这些地区的农业生产具有重要的实际意义。直到今天,农业方面所做的大多数努力在于发展适应气候温和地区的粮食作物。将来,无疑更多的努力将是致力于发展能适应地球上最广阔的干旱地区的粮食作物。在这方面具有C4途径的植物可能会起重要的作用<sup>[82]</sup>。

### 13.10 作为能源的光合作用

目前人们对利用光合作用转化的光能作为扩大我们能源的一种途径的可能性具有极大的兴趣。例如,有可能利用被细菌或适氢藻类捕获的太阳能来制造不污染而且便于运输的燃料——氢气。

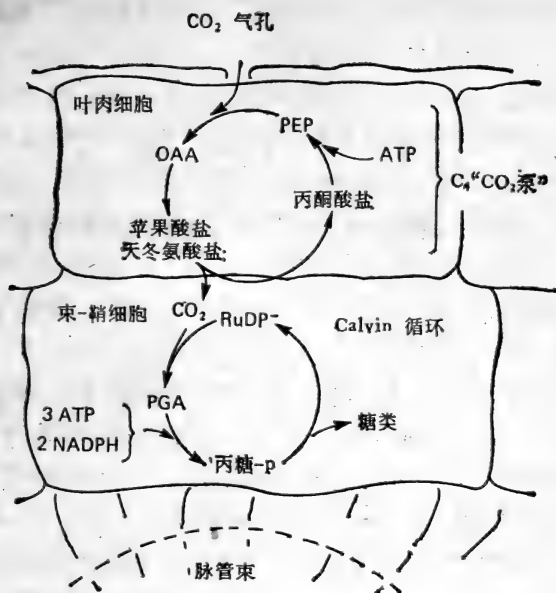


图 13-9 在具有 C<sub>4</sub> 光合作用的植物中 CO<sub>2</sub> 的固定途径。  
 PEP 代表磷酸烯醇丙酮酸, OAA 代表草酰乙酸, PGA 代表磷酸甘油酸, RuDP- 代表核酮糖二磷酸盐。

厌氧的紫色光合作用细菌不释放氧, 并且由于它们不能氧化水, 因此为了新陈代谢的需要它们必须依赖于各色各样的有机物和无机物。光合作用产生氢气需要用有机(或无机)的电子给体及一定量的氨基酸(或适量  $\text{NH}_4^+$ ) 供给适当的细菌, 并且这些细菌是处在一种与细胞生物合成需要有关的能量转化活性很高的状态。在这些条件下, 细菌通过与能量有关的方式自我调节而产生  $\text{H}_2$ 。当然, 任何一种依赖细菌生产  $\text{H}_2$  的庞大系统还将需要大量廉价和容易得到的电子给体。这个要求可能大大限制了这类系统在经济上的现实性。

当然, 最容易利用的电子给体是水, 但是只有高等植物和

藻类能够用它们的两个色素系统从水中提取电子。我们已经看到,光系统 I 可以还原其氧化还原电位低于  $-0.7\text{V}$  的化合物(13.6.1)。由于在  $\text{pH } 7$  的生理条件下氢电极的  $E_0'$  大约是  $-0.42\text{V}$ , 因此有足够的电位来产生分子氢。但是藻类一般不用光系统 I 产生的还原剂生产氢,除非这些藻类是适氢的。要达到氢适应必须把藻类如小球藻在氮气或氢气的条件下放在暗处  $10-12\text{ h}$ 。经过适当的适应条件后,在大量不同色素的藻类中,包括海洋中的红藻和褐藻以及绿藻,都能明显地看到  $\text{H}_2$  的产生。

藻类里的适应过程明显地激活了一种氢化酶,但是如果存在有氧存在时,这个酶则被钝化。光产生氢只受光系统 I 调节,而在厌氧条件下,光系统 II 的放氧系统是不起作用的。产生  $\text{H}_2$  的底物可能是厌氧代谢的一种产物,它们在适应过程中以很慢的速率积累在藻类细胞中。产生氢的底物的这种缓慢形成可能是放氢速率低的原因,放氢的速率通常只有光合作用放氧最大速率的  $10\%$  左右。

为了利用藻类氧化水,释放  $\text{O}_2$  并同时产生  $\text{H}_2$  的能力,需要对光合作用机器作相当大的改装。利用某种在它们的休止细胞(或异形细胞)中固定氮的蓝绿藻已经实现了两个不相容反应的分离。这些特殊的细胞借助于其异形细胞中很高的呼吸效率可迅速将  $\text{O}_2$  排除,从而从物理上保护了氮还原酶不受  $\text{O}_2$  的破坏作用。

也许有可能从活细胞中分离出各种光合作用的亚系统,如光化学反应中心、放氧系统和放氢系统,并可能在体外应用这些系统。例如,也许可以在适当的支持物上吸收这些光合作用成分,从而使得一个系统的产物间近得足以被下一个酶系统所用,如此等等,直到将所要的产物取出而只留下完整的吸收体系。为避免氢化酶被氧钝化,可以用一张人工膜,在它



的两边把产生  $O_2$  的反应与产生  $H_2$  的反应分开。也可采用微型密闭系统实现这种分离，但是现在我们在分离光合作用系统的成分方面的知识仍然是很肤浅的。

通过把叶绿体产生的还原能力与藻类或细菌的氢化酶相结合的办法已经证明能够实验室规模生产氢气，然而，这个体系存在的问题仍然是  $O_2$  的产生将钝化氢化酶系统，解决这个问题的办法可以是把  $O_2$  从反应混合物中除去，例如加葡萄糖和葡萄糖氧化酶。但是很不幸，这些混合体系的  $H_2$  的产额低得令人失望——只有正常光合作用平均速率的百分之几。并且这些体系既极不稳定又相当昂贵。

大约只有 10% 的农业产品是用于食物，农业和林业的“废”产物却具有十分巨大的潜在能量。谷类的谷壳、茎、锯末、木屑、纸以及破桌子都含有从光合作用过程中得到的能量。木屑通过热解可以转化成木炭和大量有用的碳氢化合物。植物材料可以发酵成为甲醇，转化成木乙醇，或者充分燃烧而释放出它的能量。

有人提出<sup>[82]</sup>，由甘蔗或甜菜光合作用产生的糖（及纤维素）可以经济地几乎毫无能量损失地转化成乙醇。在汽油中可以加进乙醇来减少对石油的需求量。直接地而不是间接地从植物得到碳氢化合物，例如把碳水化合物转化成乙醇，这在经济上也是可行的。橡胶树（*Hevea*）可以作为光合作用产生碳氢化合物的直接来源，这种碳氢化合物可以取代目前用于化工原料的石油和许多合成反应的初始原料。

总而言之，光合作用储存的能量和得到的有机物质是大量的。许多经济上的障碍妨害了这个巨大潜力的利用，希望能克服这些问题，继续在对光合作用过程的基本规律加深了解方面进行研究，必将有助于我们开发这个取之不尽的能源。

## 13.11 展 望

初看起来似乎对光合作用已进行了相当广泛而深入的研究,以致再也没有什么可做了。但是如果仔细看一下它所包括的任何一个课题,就会发现有许多著名的结果都有待进一步研究。

我们需要更多地了解关于光化学反应中心的细节。是什么使得我们叫做 P700 或 P680 的特殊叶绿素起着光系统 I 和光系统 II 的光化学陷阱的功能? 我们已经谈过,用有机溶剂萃取植物材料得到的只是叶绿素 a,但是在活的植物体中,叶绿素的吸收光谱是很复杂的,这说明叶绿素在光合作用膜中是与其它物质如蛋白质、脂类相结合的。因此,我们需要对支持那些彼此反应的色素和酶的膜系统的物理化学性质进行更深入的了解,膜的这种高度有序的结构对进行光合作用是极重要的条件。

我们需要更多地了解反应中心里的各个成分是如何能够如此高效率地实现光量子的原初转化的。

目前,我们对每个光系统的原初受体所知甚少。对于光系统 I,我们知道在 430nm 附近所观察到的吸收变化可能反映了原初受体氧化还原状态的变化。电子自旋共振研究表明,这个原初受体可能是一种结合的铁氧还蛋白。我们需要对这个物质进行更多的研究,才能彻底了解它是怎样与光化学反应中心协同起作用的。

对光系统 II 的受体就了解的更少了。C550 可能只是光系统 II 的原初受体功能作用的一个指示剂(13.6.2.1)。对这个受体的化学性质我们还一无所知。同样地,我们对光系统 II 的光化学反应中心 P680 知道得更少。

放氧机制方面我们所面临的挑战将是阐明可能是由某种含锰化合物所引起的酶“S”状态的变化。

上面仅是有待解答的几个突出的问题。通常，一个问题的解决往往能导致更多问题的答案。但是，在搞清楚大自然巧妙安排的对所有生命都至关重要的把太阳能转化成一些稳定化合物的过程之前，我们还有一段漫长的道路。

## 13.12 实 验

### 13.12.1 叶子中主要色素的分离和鉴别

在这个实验里，主要的光合作用色素是从叶子里提取的，并通过它们的吸收和荧光特征及色谱图上的颜色和位置进行分离和鉴别。

把大约 2g 的叶子和少许碳酸钙放在 10ml 冷的(置冰箱中的) 100% 丙酮中，用匀浆器或研钵制成匀浆，然后用布氏漏斗过滤。

这些色素的色层分离通常是在层析纸(大约宽 4cm、长 20cm)或纤维素薄层板上进行。薄层层析时可采用伊斯曼柯达层析板(无荧光指示剂的 13255 纤维素, No. 6064, 20cm × 20cm)。

层析板或层析纸需预先用含 8% 植物油的石油醚(50—105℃)走一遍，使溶剂前沿到达层析板或层析纸边缘 1cm 处。然后将层析板或层析纸干透。

用一个小吸量管或医用滴管吸取丙酮提取液，然后沿层析板不含植物油的一边反复滴液。但每重复一次时，需待上次的丙酮蒸发之后再作。这些操作需在微弱的光线下进行，以避免光对色素的降解作用。重复这个操作，直到获得一个暗带为止。

在甲醇:丙酮:水=15:5:1的溶剂中于暗处展开这个层析谱。为此,溶剂要放在高25cm的薄层层析缸或其它适当大小的烧杯玻璃容器的底部,然后将含有色素绿带的层析纸的一端放入溶剂中(但含色素的绿色带不要被溶剂所淹没),并将层析纸垂直向上挂住或使层析板靠在层析缸或烧杯顶部横穿的铁丝上。最后用玻璃板盖住层析缸,或用 Petri 板盖住烧杯。层析图在暗处展开,直到获得较好的分离,大约需45—75min。

层析图可用长波紫外光(360nm)照射下色素的荧光来观察。什么色素具有荧光呢?请解释为什么荧光是红色的?

记下层析图上的颜色及绿带和黄带的相对量。根据它们在层析图上的位置可以鉴别这些色素带<sup>[83]</sup>,同时亦可将色素分离,其方法是将色素带上的色素刮下来或是将色素带剪下,然后在大约10ml丙酮中洗脱即可。

如果有合适的分光光度计,则可以测定分离色素的吸收光谱。如果实验需要的话,可借助分液漏斗将色素从丙酮转移到其它溶剂中,所得光谱可与发表的曲线进行比较<sup>[6]</sup>。

### 13.12.2 与 DCIP 的希尔反应

洗净并擦干大约10g的菠菜叶子,把叶子的中央大叶脉撕下仍掉。然后将叶子的剩余部分剪成碎片,以便能放入盛有60ml 0.4M蔗糖、0.05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH7.2的缓冲液<sup>[84]</sup>和0.01M KCl 冷溶液的冷研钵内进行磨碎。

绿汁用一层“超细布”(Miracloth, Cal Biochem)或8层粗棉布进行过滤。然后在200g下离心2min,再取上清液在1000g下离心10min(用临床离心机离心时可以全速运转),弃上清液,将沉淀物(叶绿体)再次悬浮在约10ml缓冲液中。叶绿体的制备要在0℃左右进行。

将 0.5ml 左右叶绿体悬浮液和 0.5ml  $5 \times 10^{-4}M$  DCIP 储液 (0.145mg DCIP/ml 水), 加进适量的制备叶绿体用的缓冲液, 使最终体积为 10ml, 就可以用来测定 DCIP 的还原。可以将这个混合液加进比色管或试管中, 在距 100W 灯泡 15cm 处进行照射。为方便起见, 可以把它们放在幻灯机的光束里照射。为了作为暗对照, 一个试管用铝箔包起来以避免光照。所有的试管都可放在一个大烧杯中, 以便维持一定的温度 (通常为  $20^{\circ}C$  左右)。

蓝颜色的消失是 DCIP 被电子还原的结果, 这些电子是水在光合作用中被光系统 II 氧化所产生的 (13.6.2.2)。在分光光度计上测定 600nm 处光密度的变化可定量地测量希尔反应。DCIP 在这个波长上的消光系数是  $21.8mM^{-1}cm^{-1}$  [85] (即在 600nm 处, 1mM DCIP 溶液在光程为 1cm 的比色杯中产生的光密度为 21.8)。如果测出叶绿素的浓度 [86], 那么叶绿体的活性就可以用每小时每毫克叶绿素所还原 DCIP 的微摩尔数来表示。

如果把一种物质如甲胺 (用 HCl 中和) 加到反应混合物中使其浓度达到 20mM 左右, 则可测定磷酸化“解联剂”对电子输运的影响 (13.7.2)。

在照光之前将 DCMU 加入到反应混合物中可以研究除草剂 DCMU 对希尔反应的影响 (图 13-5)。为此可将 0.23mg/ml 的 DCMU 溶在乙醇或甲醇中, 以制成  $10^{-3}M$  的 DCMU 储液, 将 0.1ml 这种溶液加到反应混合物中将会强烈抑制希尔反应。

温度对希尔反应的影响可通过在不同温度的水浴中进行希尔反应来研究。如果能够对光强度进行相对测量或绝对测量的话 (光电池、光度计或热电堆), 则可以研究 (在某个温度或几个温度上) 反映 DCIP 的还原速率与光强度的函数关系

的光曲线。另外还能测定不同波长光对希尔反应的影响。为此，可用一台幻灯机，装上方形有色玻璃或干涉滤光片。如果发热不是很严重的话，则可将 Kodak Wratten 明胶滤光片贴在玻璃上以提供适当波长的光化光。

(张 茵译 沈 恂校)

## 第14章 生物发光

John Lee

(乔治亚大学生物化学系)

14.1	序言 .....	447
14.2	化学发光反应 .....	449
14.3	关于生物发光反应的概述 .....	452
14.4	萤火虫的生物发光 .....	454
14.5	海萤的生物发光 .....	458
14.6	腔肠动物的生物发光 .....	460
14.7	细菌的生物发光 .....	464
14.8	过氧化物系统 .....	468
14.9	低水平发光, 生物的化学发光 .....	469
14.10	生物发光的起源和功能 .....	472
14.11	生物发光反应的应用 .....	474
14.12	实验 .....	477

### 14.1 序 言

对大多数人来说, 生物发光是以萤火虫的闪光或是在波浪起伏的海水表面出现的“磷光”为代表的。诚然, 由于萤火虫无处不有, 因此它的生物发光反应已经得到了广泛研究, 结果发现这种发光体系是各种各样酶促过程的原型, 这些酶促过程在多种生物发光的生物中产生光, 从海洋细菌到南美洲的大的发光甲虫。通常所谓生物发光是指一种高效率的冷光

发射,这些生物为了生存的目的而利用生物发光,虽然在许多情况下这个目的也许仍然是一种猜想。另外,人们还发现越来越多的生物反应都能发射很弱的光,这种低水平的发光被称为“生物的化学发光”。生物发光是如此广泛地存在于许多生物门类之中(虽然一个生物门类中的很多成员并不具有这种性质),这个事实说明在生物化学的进化中很早就出现了发光的能力,而效率高的发光能力则是生物化学发光的一种继发的适应,这种适应性使这些生物能在它们的生物学环境中更有效地进行竞争。

在许多陆栖生物中存在生物发光,但是最常见的是在海洋里,特别是在深海中。那里几乎所有种属的生物都能发光。除萤火虫外,还有发光的真菌(“狐火”)、发光的蠕虫和仅在新西兰发现的淡水蜗牛(肩棘螺 *Latia*)、另一种类型的甲虫(腔翅目)、南美洲发现的“铁路蛆虫”和蚯蚓。在海洋中,发所谓“磷光”的主要是原生动物,但最大的生物发光族要算腔肠动物,即软体珊瑚虫(珊瑚虫纲),海蜇(水母纲)和梳状水母(栉水母门)。还有很多种类的发光鱼,其中有些鱼的发光是来自于与它们共生的细菌。另外能发光的还有海洋中的各种蠕虫(毛翼虫属 *Chaetopterus*, 柱头虫属 *Balanoglossis*, 齿裂虫属 *Odontosyllis*), 一种蛤(海笋属 *Pholas*), 甲壳类(海萤属 *Cypridina*), 鱿鱼(萤乌贼属 *Watasenia*), 虾(*Holophorus*)和棘皮动物(海星和海胆)。

生物所发光的颜色范围从铁路蛆虫所发的红光到大多数海洋生物所发的特征的深蓝光。因此,在研究者的头脑中可能产生的第一批问题是:是否所有这些生物发光的系统都是相同或者类似的?与光发射有关的反应和分子是什么?为什么发光的颜色不同?人们首先测定了生物(活体)发射的光谱,特别重要的是发射光谱最大值( $\lambda_B$ )的位置。然后设法得



到将能进行反应并以高的效率产生相同的生物发光  $\lambda_B$  的提取液,发光效率以生物发光的量子产额  $\phi_B$  度量,即反应中每个反应物或产物分子所产生的光子数目。在进行了这些测量并尽力获得化学纯的成分后,就可以从化学意义上说明导致发光的那个反应的特征了。由于化学发光反应是一种放出足够的能量以在系统内产生一个激发态分子的反应,所以生物发光亦可看做是酶催化的化学发光。

让我们回到上述的第一个问题。Boyle 在17世纪就发现细菌和真菌的生物发光需要氧气,现在知道氧是以某种形式参加了所有的生物发光系统。上个世纪末,Dubois 发现从萤火虫的发光器官中能提取出两种化合物,一种用热水浸出,另一种用冷水浸出。当把它们混合时,则给出一个短暂的生物发光的闪光。冷水浸出液对热不稳定,称为萤光素酶,热水浸出液称为萤光素。Dubois 用蛤(海笋属 *Pholas*)做了类似的观察,但是发现,蛤的萤光素和萤火虫的萤光素酶之间或者蛤的萤光素酶与萤火虫的萤光素之间不发生交叉反应。一般说来,人们发现,同一类发光生物萤光素和萤光素酶往往能交叉反应,不同种类发光生物之间的这种交叉反应则不常见,而如果关系更远的话,这种交叉反应就极为罕见。现在知道这是由于萤光素的化学结构所致,例如,海萤和萤火虫的萤光素在化学结构上就差别很大。因此,从一种发光生物中提取的萤光素不能作为另一种发光生物的萤光素酶的底物。

所有的生物发光反应似乎都是酶-底物类型的反应,但复杂程度不同;某些生物发光反应涉及三种或四种底物,而另一些生物发光反应甚至需要三个或四个酶的体系。

## 14.2 化学发光反应<sup>[1,2]</sup>

许多化学反应进行时能释放足够的自由能而把参加反应

的物质之一激发到能发射光的电子激发态，若被激发的是一个反应产物，则这种反应过程叫做“直接化学发光”。



星号\*表示C处于单线激发态。化学发光的光谱分布与C的荧光相一致，[反应式(14-2)]。但是激发能也可以传到另一个未参加化学反应的分子D上，这种过程就叫做“间接化学发光”或“敏化的化学发光”。



在这种情况下发射的是D的荧光，除了荧光之外，这个过程并不使D发生任何化学改变。在某些敏化的化学发光中，原初激发产物C的性质已经弄清楚或是推测出来，而D是通过2.7中讨论过的能量转移过程之一被激发的。在激发分子之间也可能发生电子传递作用，在大多数情况下，C的性质没有弄清，其中的一例是在有染料存在时草酰氯与过氧化氢的反应，该反应是已知的最有效的化学发光反应之一，这个反应是用于市售的“发光指挥棒”中的反应。

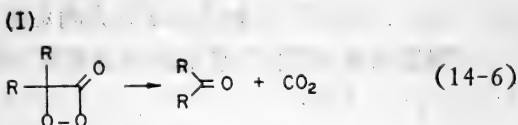
众所周知，在气相中两个分子间的放热反应若没有第三者存在是不能发生的，因为需要由第三者带走过剩的能量，于是低气压下的气体反应是绝热的，即能量不会立即从体系中逸出，如果释放的能量超过了产物的第一电子激发能级，这些绝热反应中的许多都是化学发光的，无论如何，这个释放的能量至少会提高产物的基态振动能态并产生红外化学发光。

在溶液中，与溶剂的振动相互作用是如此占优势，以至能量的释放不能是绝热的，除非这种作用过程快到使由于与溶剂分子的碰撞而引起的迅速冷却大大超过能量的释放。电子传递就是这样一个过程，它是给体(D)和受体(A)之间的单

电子氧化，给体和受体之间的电势差大到超过了其中一个的第一电子激发单线态的能量。二苯蒽的阴离子自由基  $\text{DPA}^{\cdot -}$  与它自己的阳离子自由基  $\text{DPA}^{\cdot +}$  之间的反应就是一个很好的例子，这个反应叫做“湮没反应”，人们发现大约 10% 的“湮没反应”使产物成为二苯蒽的激发态。



还有第二种过程——中间产物二氧丁环酮 [I，反应式 (14-6)] 的协调的键断裂，近来它作为一种可能的化学发光激发机制受到很大重视。这种看法的要点是：因为多数有效的化学发光反应都包括氧，在反应过程中关键的中间产物可能是一种高能物质 I，通过协调的键断裂它可能是个大的释能源，同时由于在键的重排时要求对称性守恒，物质 I 将必须使它的分解产物之一处于激发态(反应式 14-6)。



这个推测还只是定性的，因为二氧丁环的环是杂环，而且不能严格的应用 Woodward-Hoffman 对称性守恒定则，然而实验工作者很快便发现，二氧丁环酮分解产生的是产额很高的三线态和很少量的单线态产物，而不是预期的激发单线态产物。如果可以合成出将分解为荧光很强的酮的二氧丁环酮，则预计将有高的化学发光效率。

量子产额是化学发光反应的一个重要表征，这就正如同量子产额是光化学反应的一个重要表征一样(参阅 3.6)。为了符合光化学第二定律，即一个光子和一个分子间的对应性，我们把化学发光的量子产额  $\phi_c(A)$  或生物发光的量子产额  $\phi_b(A)$  定义为发射的光子数被起反应的 A 分子数除。注意，

这个定义与光子射入该系统时量子产额的定义相反。

直接化学发光的量子产额  $\phi_c$  是两个效率的乘积,一个是发射体 C 的荧光效率  $\phi_F(C)$  [反应式(14-2)],另一个是使产物变成激发态的效率  $\phi_E$  [反应式(14-1)]。

$$\phi_c(A) = \phi_E \cdot \phi_F(C) \quad (14-7)$$

在 2.4.3 中我们已经看到若干竞争过程是如何使  $\phi_F$  减小到 1 以下的,对大多数溶液中的化学发光反应,发现  $\phi_E$  远小于 1,其理由尚不清楚。但在气相反应中,对于一些已掌握了可靠资料的生物发光反应,令人吃惊地发现  $\phi_E$  可以非常接近于 1。因此,对生物发光中的激发提出的任何机制都必须能解释这个重要的现象。

显然  $\phi_E$  不能大于 1,这就意味着  $\phi_c(A) < \phi_F(C)^*$ ,于是不仅假设的发射体 C 的荧光光谱必须与它的化学发光光谱相同,而且它的荧光产额还必须充分满足这个不等式。此外,  $\phi_c$  的测量也是确定该反应的化学计算的一种方法。显然,对反应式 (14-1) 有:

$$\phi_c(A) = \phi_c(B) = \phi_c(C)$$

但如果反应变成:



则:

$$2\phi_c(A) = \phi_c(B) = \phi_c(C)$$

### 14.3 关于生物发光反应的概述<sup>[3,4]</sup>

现在对六个或更多个生物发光体系、萤光素 ( $LH_2$ ) 的化学结构及萤光素酶 (E) 特性的细节的了解使人们提出一个导

---

\* 原文中的不等式误为  $\phi_F(C) < \phi_c(C)$ 。——译者

致光发射的总的反应序列，这些反应中只有一个反应是真正的化学发光反应，但是必须把所有这些反应从整个系统中分解出来，才能对这个真正的化学发光反应单独进行研究。

“生物发光系统”一词将用来描述组合在一起的一系列所进行的反应，每个生物发光系统可以包含全部所有的反应或者仅仅其中的几个。

底物一开始与萤光素酶键合之后，其反应顺序的第一步可能是萤光素的激活。

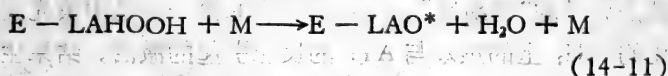


其中A是辅助因子，例如在萤火虫的生物发光中A就是腺苷三磷酸(ATP)。

海萤的生物发光不需要激活，它的第一步反应即我们提出的机制中的第二步反应是氧合作用：

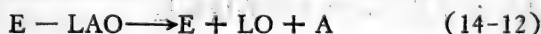


然后，反应式(14-11)才是真正的化学发光反应，即激发：



其中M是可能需要的第二个辅助因子，就象生物发光海萤提取液(aequorin)的一个可能反应中的  $Ca^{++}$  一样(见下)，而  $H_2O$  是一个可能的产物，对萤火虫来说不是  $H_2O$  而是  $CO_2$ ；或者M也可以是将在该反应过程中被氧化成  $MO_2$  的另一个底物。 $E - LAO^*$  的退激引起光的发射。

最后，生物可能要再度利用这个酶，即酶的“周转”。

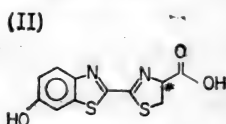


显然，在萤火虫体内不需要这样做，因为它具有在同时进行的一些反应的寿命中所需要的全部萤光素酶。而在离体情况下，萤火虫的萤光素酶和大多数其它类型的萤光素酶则可以反应多次。

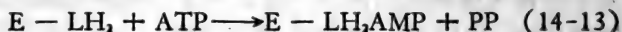
显然,为了从化学方面了解生物发光反应,首先必须弄清楚由反应式(14-10)所产生的氧合产物的性质,然后方能推测(14-11)式的激发过程。在以后各节中,我们将分析一些生物发光系统,并将说明涉及到什么样的反应序列和目前为止我们对激发反应的了解进展到什么程度。

#### 14.4 萤火虫的生物发光<sup>[1]</sup>

萤火虫的萤光素 ( $\text{LH}_2$ ) 是 D(-)-2-(6'-羟基-2'-苯并噻唑基)- $\Delta^2$ -噻唑啉-4-羧酸(II)。

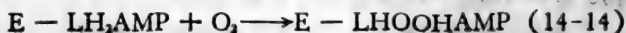


符号 (#) 指示光学上的活性中心,已经弄清楚这个活性中心就是分子的“交易端”。反应顺序中的第一步是由萤光素酶催化的  $\text{LH}_2$  上的羧基与 ATP 的反应引起的激活,结果生成萤光素腺苷单磷酸衍生物  $\text{LH}_2\text{AMP}$ ,同时释放出焦磷酸 PP。

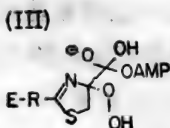


萤光素的左旋 [L(+)] 异构体也能进行这个反应,但是它的腺苷酸 L(+) $\text{LH}_2\text{AMP}$  与萤光素酶和氧反应不产生光。

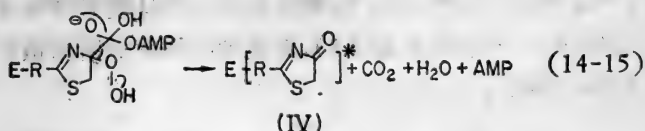
氧合作用分几步进行,第一步可能是反应式(14-14):



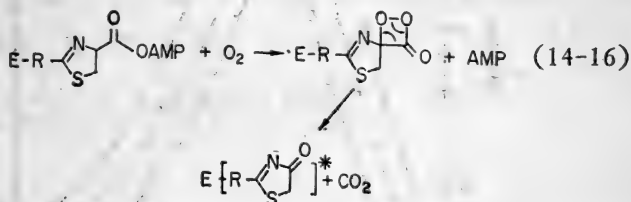
人们提出这个中间产物的结构是



结构式中的 R 代表结构式 (II) 中的苯并噻唑基。下一步是激发, 它的总反应是:



另一方面, 有一些人还提出氧合的中间产物是二氧丁环酮, 它是由分子氧直接攻击到萤光素腺苷酸上而形成的[反应式(14-16)]。



由  $^{18}\text{O}$  标记的  $\text{O}_2$  形成的这种二氧丁环酮的分解将产生标记的  $\text{CO}_2$  和产物 IV。在强碱性的二甲基亚砷中, 经过萤光素的化学发光反应, 产物 IV 也被标记, 但当生物发光反应在水中进行时,  $\text{CO}_2$  不被标记, 除非水被  $^{18}\text{O}$  标记, 在这种情况下  $\text{CO}_2$  中的一个氧被标记上。这就是人们为什么为了生物发光反应中的第一步而提出结构 II, 因为结构 II 既包括了分子氧又包括了来自于溶剂的  $\text{OH}^-$  的加成。根据类似的资料, 对下一节里腔肠动物的发光反应(14-8)式也提出了一个类似的机制。

人们发现  $\phi_{\text{B}}(\text{LH}_2)$  是 0.8,  $\phi_{\text{B}}(\text{O}_2)$  和  $\phi_{\text{B}}(\text{CO}_2)$  也大致都是这个数值。这意味着  $\phi_{\text{E}}$  必须接近于 1, 但不幸的是产物 IV 太不稳定, 因而不能精确地测量它的荧光。

活体和离体的生物发光光谱是相同的, 但最大值的  $\lambda_{\text{B}}$  与种属有关。图 14-1 给出代表所观察到的  $\lambda_{\text{B}}$  的范围为 552—

557nm 的三个光谱。当从一个特定种属得到的萤光素酶与合成的萤火虫萤光素反应时,对这个种属来说离体的  $\lambda_B$  与活体的  $\lambda_B$  相同。因此,这个酶的活性部位的环境必须给发光分子的能级一个扰动(参阅 2.5),其扰动的程度是所用萤光素酶的种属的特征。

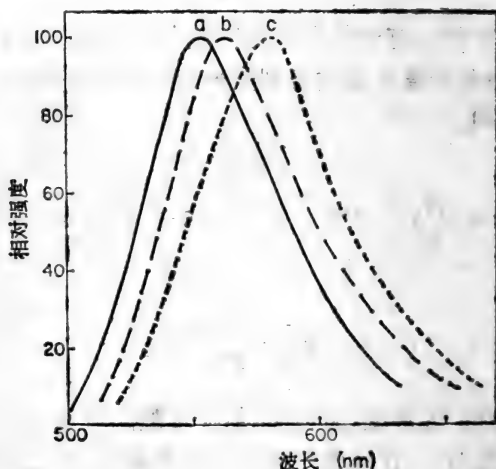
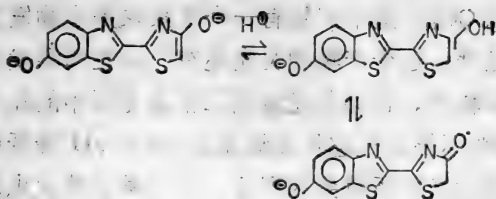


图 14-1 萤火虫的活体生物发光光谱。  
(a) *Photurus pennsylvanicus*; (b) *Photinus pyralis*; (c) *Purophorus plagiiothalamus*。

如果萤火虫的萤光素在疏质子溶剂中与氧反应,则能产生化学发光,疏质子溶剂就是像二甲基亚砷那样的溶剂,它不能为氢键提供任何质子,如果溶液不含水分并且碱性很强的话,那么化学发光是黄绿色,实际上与生物发光光谱是相同的。当碱性较弱时,所观察到的是效率较低的红光发射。黄绿光的发射 ( $\lambda_C$  562nm) 来自 V, V 是一种双阴离子,它在溶液中能以与辐射速率相竞争的速率加上一个质子,从而形成发射红光 ( $\lambda_C$  615nm) 的物质 VI<sup>[2]</sup>。



(V)



(VI)

因此，人们相信生物发光来自于 V。萤光素酶能阻止 V 质子化，除非  $\text{pH} < 6$  (图 14-2)。升高温度或加入重金属离子 ( $\text{Zn}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$ ) 也能诱发红光发射带，显然这两者都是引起酶干扰该分子而使它能在发光之前失去其质子的全部条件。

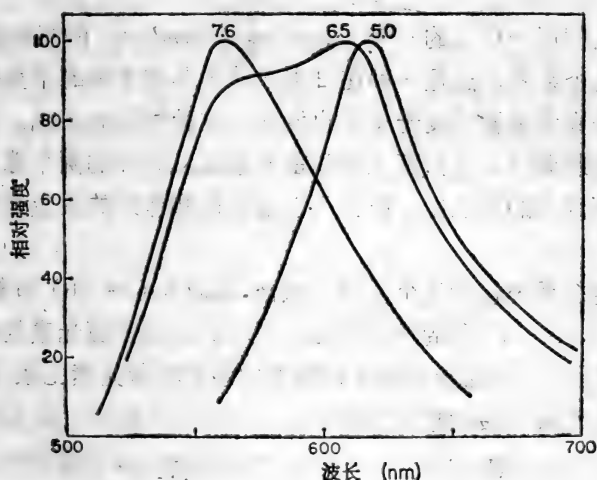


图14-2 pH 对外萤火虫生物发光光谱的影响， $\lambda_B$  616nm 带被归一化为 1，但是它的绝对贡献不足  $\lambda_B$  562nm 带的一半。每个光谱上标明了 pH 值。

在我们研究其它生物发光体系之前，让我们先小结一下我们对萤火虫反应的了解，它的萤光素分子的结构已被精确

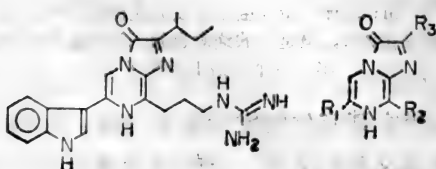
地测定,并且发现它与 ATP 和萤光素酶上的  $O_2$  反应生成某一个产物和  $CO_2$ 。这个产物有一个看来象是生物发光光谱的荧光发射光谱,这个产物的荧光还有一种在两种发光物质之间的酸-碱转变,正如萤光素在二甲基亚砷中的化学发光一样,如果碱性不很强时它是发红光的,就象 pH 降低或温度升高时在生物发光中所看到的现象。不同种属萤火虫的萤光素酶产生的黄光谱的发射极大值稍有不同,这说明不同种属萤火虫的萤光素酶对环境的扰动略有不同。当我们和其它生物发光系统打交道时,我们将会遇到这些同样或类似的现象。

## 14.5 海萤的生物发光<sup>[1,4]</sup>

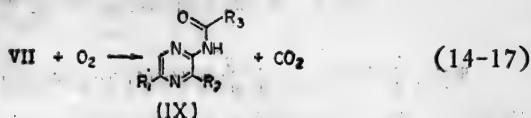
人们用一种小的介壳 *Cypridina hilgendorffii* 的提取物研究了 this 系统,这是一种在日本水域中非常丰富的甲壳类动物。在许多种属的发光鱼中也发现了这种相同的系统。当介壳受到刺激时,它把萤光素和萤光素酶从分开的两个腺体中分泌到周围的海水里,因此可以说体内和体外的反应是相同的。

这个系统包括三个反应: 氧合,反应式 (14-10) 和激发,反应式 (14-11) 和周转,反应式 (14-12)。海萤萤光素的结构为 VII, 为了与腔肠动物生物发光中涉及的萤光素比较,我们将把它写成一般的形式 VIII。

(VII)      (VIII)



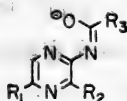
由海萤萤光素酶 (E) 引起的总的生物发光反应是



( $R_1$  = 吡啶基;  $R_2$  = 精氨酸;  $R_3$  = 异丁基; 参看 VII)。该生物发光反应的  $\phi_B$  是 0.3, 光谱是特征不明显  $\lambda_B$  在 460nm 的蓝光发射, 它正好对应于 IX 与 E 结合后的荧光光谱<sup>[6]</sup>。在水溶液中, 自由的 IX 是不发荧光的。因此, E 提供了一个环境, 此环境抑制了激发态能量的非辐射损失。

在碱性的二甲基亚砜中, VII 和一般结构 VIII 的化合物 ( $R_1$  = 苯基或 H;  $R_2$  = 甲基或 H;  $R_3$  = 甲基) 与  $\text{O}_2$  反应产生一个明亮的绿色化学发光。然而, 在生物发光的情况下, 尽管  $R_3$  可以有其它的烷基取代基, 但  $R_1, R_2$  必须和 VII 结构中的一样。绿色的化学发光据信是来自 X, 即 IX 的阴离子。

(X).



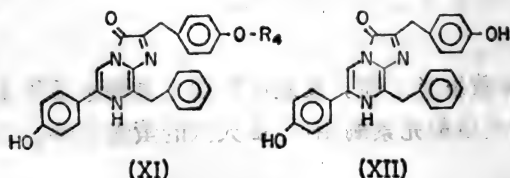
因此, 在海萤发光之前, 反应中的萤光素酶必须防止去质子化, 这和萤火虫萤光素酶相反, 萤火虫的萤光素酶必须防止质子化。

对总的反应 [(14-17) 式] 中每个化学反应步骤的性质及  $^{18}\text{O}$  标记方式的性质, 仍有一些不清楚的。在海萤的生物发光中,  $\text{CO}_2$  中的一个氧原子是来自分子氧的, 正如对激发反应中二氧丁环酮型的中间产物所预计的情况一样。

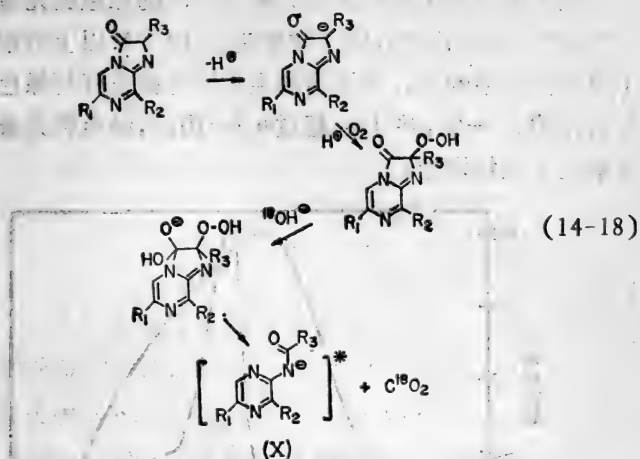
## 14.6 腔肠动物的生物发光<sup>[7]</sup>

腔肠动物是由两个主要的亚门(刺胞亚门和栉水母亚门)组成的一组变化多样的生物。刺胞亚门中的一些纲包括珊瑚虫纲,如软体珊瑚虫 *Renilla reniformis* (“海三色紫罗兰”),水母纲(例如海蜇)如 *Aequorea aequorea* 及钵水母纲。上述种属都是研究得最多的生物发光系统。所有腔肠动物的生物发光系统都包括反应式(14-9)——(14-12)中所示的全部四个一般的反应。尽管化学机制对所有这些种属都是相同的,但是刺胞亚门的各纲之间在激活反应的步骤上是不同的,并且就激发的性质来说各亚门也有差别。事实上,现在这些系统要求我们把更复杂的细节引进那个由反应式(14-9)——(14-12)所代表的简单图象中去,并且第一次把“敏化的生物发光”现象[参看反应式(14-3)]引进了这幅图象。

腔肠动物的萤光素具有一般的结构 VIII, 对于海三色紫罗兰 *Renilla*, 萤光素有一个 XI 的结构( $R_4$  还不知道), 而对于水母 *Aequorea*, 则有一个 XII 的结构。读者应该注意到它们, 可以看到 XII 很像海蜇的萤光素结构 VII。



光反应产生  $X$  和  $CO_2$ 。用  $^{18}O$  标记的  $O_2$  和  $H_2O$  得到的标记图指出,  $CO_2$  中的一个氧原子来自  $H_2O$ , 而不是来自分子氧。这与萤火虫的发光反应中所观察到的现象一样, 因此人们提出了一个类似的机制。



这个机制是用 *Renilla* 的萤光素研究得出的,但这些中间产物仍然是推测性的。根据在疏质子溶剂二甲基甲酰胺中化学发光的研究,人们认为阴离子 X 是发射体,与离体情况  $\lambda_B$  位于 490nm 相比,这个化学发光的  $\lambda_C$  是 480nm,二者均是无结构的较宽的光谱。在碱性二甲基甲酰胺中, $\lambda_C$  是 538nm,它与双阴离子的荧光对应。由于中性产物的荧光最大值在  $\lambda_F = 402$  nm,单阴离子的荧光最大值在  $\lambda_F = 480$ nm,  $\phi_F$  是 0.06。在水溶液中这两种产物均不发荧光。因此,化学发光反应必须还要直接产生一个激发的单阴离子。对二甲基甲酰胺中的化学发光和由萤光素酶产生的生物发光两者来说,其激发的单阴离子的质子化比它的辐射发光速率低。 $\phi_B$  是 0.05,大大高于  $\phi_C$  0.001。于是,除了在发光前阻止激发态的质子化外,萤光素酶的另一个功能必须要使  $\phi_E$  接近于 1。

然而,刺胞亚门的活体生物发光是一个窄的有结构的发射, $\lambda_B$  为 509nm,这与可以从这些生物的提取物中提纯的“绿色荧光蛋白”的荧光光谱完全相同,在图 14-3 中比较了离体

生物发光和绿色荧光的光谱。 $\phi_F$  为 0.7 的绿色荧光蛋白没有任何萤光素酶的活性,但是如果它以  $10^{-5} M$  以上的浓度存在于离体反应中的话,则发出的生物发光就正好与绿色的荧光和活体的  $\lambda_B$  一致,并且  $\phi_B$  超过 0.2。因此,绿色荧光蛋白显然是敏化了生物发光。

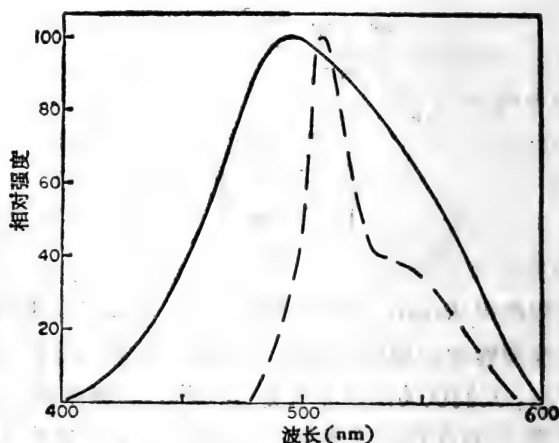
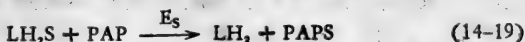


图 14-3 由 *Renilla* 的萤光素酶的体外反应得到的生物光发射光谱(实线)和“绿色荧光蛋白”的荧光发射光谱。

在栉水母门的提取物中没有发现任何绿色荧光蛋白,其体内的生物光是一个较宽的无结构的发射谱,  $\lambda_B \sim 490nm$ , 它比离体的  $\lambda_B$  红移 3—9nm<sup>[8]</sup>。

在以珊瑚纲为一方和水母纲、栉水母纲为另一方之间,在激活和氧合这两个步骤的性质上存在着重大区别,这与它们在化学机制上的明显相似形成了对照。珊瑚虫纲给出一个依赖于氧的萤光素—萤光素酶反应,而水母纲及栉水母纲则不依赖于氧,并且至今尚未得到它们的分离开的萤光素和萤光素酶,而只得到一个叫作“光蛋白”的蛋白质复合物,它在加入  $Ca^{++}$  时能发光。

可以把腔肠动物的生物发光归纳为下面的反应图解：



人们已从 *Renilla* 中得到了萤光素硫酸盐  $\text{LH}_2\text{S}$  ( $\text{LH}_2$  为 XI) 及硫代激酶  $\text{E}_s$ 。激活反应[反应式(14-19)]需要一个辅助因子 3',5'-二磷酸腺苷 PAP, 同时释放出相应的硫酸盐 PAPS。在动物体内萤光素硫酸盐可能是一种储存的形式, 因为游离的萤光素在水溶液中会迅速地自氧化。在各门和各纲的腔肠动物中均已发现了萤光素硫酸盐。还从 *Renilla* 中纯化出一种结合了萤光素的蛋白  $\text{E}_B$ , 当加入  $\text{Ca}^{++}$  时  $\text{E}_B$  释放出  $\text{LH}_2$  [反应式(14-20)]。这个过程可能有在整个动物体内控制闪光的功能。因此, 在某种意义上讲, 硫代激酶和结合蛋白在激活反应中均起作用。

下两步是萤光素酶催化的氧合[反应式(14-21)]和激发[反应式(14-22)]。但是取自珊瑚虫纲和水母纲的萤光素酶在光反应上必然有不同的性质, 这是因为在水母纲中这个被缚束的氧合的中间产物是能够提取出来并且稳定的, 为了发光需要  $\text{Ca}^{++}$ ; 在珊瑚虫纲里这个中间产物是不稳定的, 不需要  $\text{Ca}^{++}$ , 而是立刻反应而发光。如果 *Aequorea* 的萤光素与 *Renilla* 的萤光素酶反应则出现同样的结果, 结果表明: 这种使中间产物稳定的性质是由萤光素酶本身决定的, 它不决定于萤光素。

再往下的一步[反应式(14-23)]是在有绿色萤光蛋白  $E_G$  存在时的敏化作用,这个过程的机制还不清楚,但是可能需要在  $E$  和  $E_G$  之间先结合在一起。

如果在结合着  $E_B$  的 *Renilla* 的萤光素和萤光素酶的混合物中加入  $Ca^{2+}$ ,所看到光(图 14-4,可溶的情况)在十分之几秒内很快增强,然后很缓慢地减弱,这与刺激动物时得到的活体情况的闪光(图 14-4)很不相同。这个差异可以用以下所

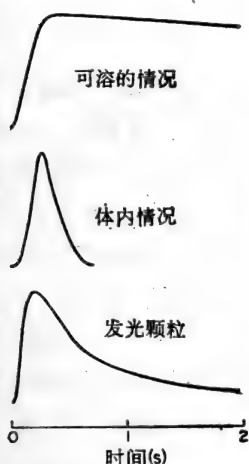


图 14-4 在 0 时刻加  $Ca^{2+}$  从 *Renilla* 的生物发光得到的闪光,讨论请参阅正文。

观察到的事实来解释,人们发现 *Renilla* 的发光器官或光细胞是由叫作发光体的小得多的结构组成,每个发光体又含有数百个发光颗粒,是直径大约  $0.2\mu m$  的包有膜的小胞囊,里面含有  $E_B$ ,  $LH_2$ ,  $E$  和  $E_G$ 。当加入  $Ca^{2+}$  时,发光颗粒的闪光很象体内的闪光(图 14-4)。因此,人们相信酶被包在发光颗粒之中,结果就以产生体内动力学的方式控制  $Ca^{2+}$  的瞬时浓度。

因此,在这些比萤火虫进化程度更低的生物中,我们看到了一个复杂的多酶的生物发光系统和对发光过程的敏化。萤火虫已“懂得”把激活反应和光反应放在同一萤光素酶分子上,完全靠一种直接但是高效的化学发光。下节我们要看看更低级的生命形式——细菌。

## 14.7 细菌的生物发光<sup>[1,3]</sup>

发光的细菌大部分出自海洋,同时人们发现这些发光细



菌既有独立生活的,又有与某些鱼类共生的。虽然体外反应比体内反应研究的更多,但是体内和体外的两个系统中可能都是一些同样的成分进行反应。如果从细胞提取物中提纯出萤光素酶,则光反应需要还原的黄素单核苷酸 ( $\text{FMNH}_2$ )、氧和一个碳链长度大于七个碳原子的脂肪族醛 ( $\text{RCHO}$ )。与已经讨论的其它生物发光反应相反,在细菌系统中不产生二氧化碳,而是醛被直接氧化成对应的酸,例如葵醛产生葵酸。其它鉴别出来的产物是  $\text{FMN}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

关于反应机制中能分成激活和氧合两部分的一些反应步骤,目前还没有完全一致的看法。如果  $\text{FMNH}_2$  和氧与萤光素酶混和,然后加入脂肪族醛,仍可观察到光效应。因而,人们推测由萤光素酶催化的  $\text{FMNH}_2$  和  $\text{O}_2$  的反应形成了某些中间产物[反应式(14-24)(14-25)]:



$\text{X}$  代表一个或几个中间产物,这时还有游离的  $\text{H}_2\text{O}_2$  出现。若  $\text{RCHO}$  加入的太晚,则产生光的能力降低,它的解释是由于  $\text{X}$  的断裂产生了更多的  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{FMN}$  [反应式(14-26)]:



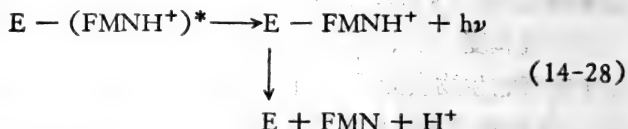
$\text{X}$  断裂的速率强烈地依赖于温度和从中分离萤光素酶的菌种。一般来说,在室温下  $\text{X}$  丧失其发光活性一半的时间是 5—20 秒,而在  $0^\circ\text{C}$  下可长达 1 小时。

激发反应是:



其中  $\text{RCHO}$  具有萤光素的作用。 $\text{Y}^*$  代表发射生物光的分子,但对此看法众说纷云。几种意见都认为黄素在发光过程中起着重要作用,一种看法认为发射体是  $\text{FMNH}^+$  ( $\text{FMN}$  的阳离子),另一种看法认为发射体是取代的还原型黄素中间产物,

第三种看法则认为降解的是黄素结构，最后这种看法较难与这样一个事实协调一致：反应的最后，萤光素酶“周转”并将 FMN 放回到溶液中。FMNH<sup>+</sup> 假说预言下面的反应将容易发生：



与这些看法相反，有人报道 FMN 可以与 X 分开，而剩下的部分仍然具有产生光的活性。此外，最近还从细菌的提取物中分离和纯化出一种与蛋白质结合的发色团，这个发色团具有与生物发光相同的荧光。人们认为这个发色团起着敏化剂的作用。

$\phi_B$  的值反映了反应的化学算法。人们已经证明  $\phi_B(\text{RCHO}) = 2\phi_B(\text{FMNH}_2)$ ，这意味着在化学计量上对每个 RCHO 需要用 2 个 FMNH<sub>2</sub>，但这点还有争议。 $\phi_B$  的绝对值取决于所用萤光素酶的类型， $\phi_B(\text{RCHO})$  的值可高至 0.17，低到 0.04。

生物光发射光谱都是较宽和无结构的。活体内  $\lambda_B$  的范围从 472—505nm，取决于细菌的类型。但是在体外所有发光细菌的  $\lambda_B$  都集中在 490nm 附近。从体内到体外生物光发射谱移动的例子如图 14-5 所示。移动的原因还不清楚，但可能是某种环境的扰动。FMN 是该反应唯一的荧光产物，在量上它是由 FMNH<sub>2</sub> 形成的。但是生物发光谱相对 FMN 在自由溶液里的荧光有明显的蓝移(图 14-6)，这不能解释为由于酶的结合而引起的扰动，因为大多数结合了 FMN 的酶往往使荧光猝灭，并且只产生很小的蓝移(小于 10nm)。另外，在像 77K 醚-异戊烷-丙酮这样强烈扰动的环境中，黄素荧光表现出清晰的振动结构，这种振动结构在生物光发射谱中是不明

显的(图 14-6)。

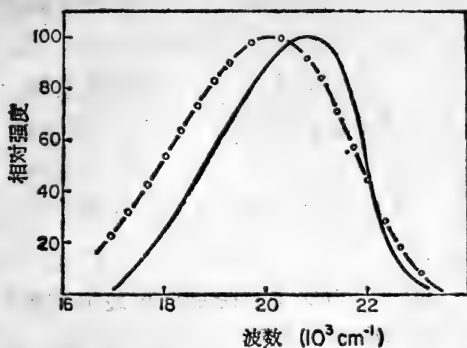


图 14-5 *Photobacterium phosphoreum* 细菌活体(实线)和离体(虚线)的生物发射光谱,圆圈是 77K 下  $\text{FMNH}^+$  在刚性溶剂中的荧光光谱。

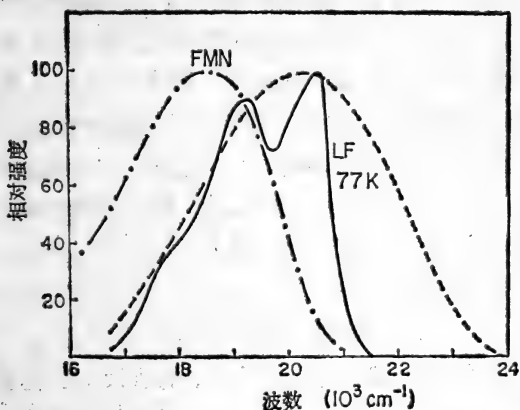


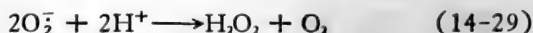
图 14-6 FMN 在水中 25°C 的荧光光谱(点划线)、光黄素(LF)在玻璃态中 77K 的荧光光谱(实线)和细菌萤光素酶体外反应产生的生物发光的荧光光谱(虚线)。

对发光分子的本质的所有这些看法都是基于它们的荧光和生物发光之间有一定程度的类似性。如图 14-5 所示,在接近刚性的溶剂中,  $\text{FMNH}^+$  的荧光与体外生物发光是相同的。

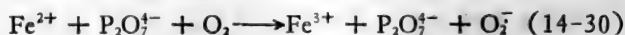
FMNH<sup>+</sup> 假说的要求是：萤光素酶必须在辐射过程发生之前防止质子的丢失，且需将 FMNH<sup>+</sup> 分子保持于刚性构型中，这是 FMNH<sup>+</sup> 产生高效荧光所必需的条件。人们已经注意到，我们在萤火虫和软体珊瑚虫 *Renilla* 的萤光素酶上也已看到同样的这种阻止质子传递的性质。

## 14.8 过氧化物系统<sup>[3,9]</sup>

人们发现若干生物发光系统是通过过氧化氢而不是分子氧起作用的。这些生物发光系统是海笋 (*Pholas dactylus*)，蚯蚓 (*Diplocardia longa*)，*Balanoglossus* (海中的“橡果”蠕虫)，*Chaetopterus* (一种海中环节蠕虫) 和某些棘皮动物。特别是，通过对 *Pholas* 系统 (海笋属体系) 的研究得到的一些结论可能适用于所有这些系统。其中的一点认为超氧化物阴离子 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 是一个活泼的中间产物，它由萤光素酶分别与 O<sub>2</sub> 或过氧化物反应产生，或者与它们两者同时反应产生。从人们目前对一种叫作超氧化物歧化酶的酶有着极大的兴趣这一事实来看，这种可能性是非常吸引人的，在所有的需氧细胞中都发现了这个酶，它的功能似乎是通过迅速催化的歧化作用 [反应式 (14-29)] 除去 O<sub>2</sub><sup>-</sup>，



从而阻止了这个中间产物产生不希望的副反应。这些萤光素酶中的某些必须催化式 (14-29) 中反应的逆转，或者甚至可以只由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub> 产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup>，类似于分子氧和与像焦磷酸那样的配位体络合的 Fe<sup>2+</sup> 的反应：

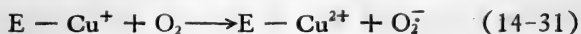


人们还发现这些萤光素酶具有类似过氧化物酶的特性，例如催化过氧化氢对抗坏血酸的氧化。用像辣根过氧化物

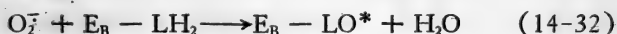
酶、FMNH<sub>2</sub> 等其它的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 源也可以使萤光素化学发光。显然, 这种化学发光具有与生物发光相同的量子产额和发射光谱<sup>[9]</sup>。

*Pholas* 萤光素结合在一个蛋白质(分子量 50,000)上, 如果用譬如说温和的消化来影响这个蛋白质的完整性, 它就会被钝化。该萤光素的化学结构目前还不知道, 这个蛋白质类似于 *Renilla* 中那个与萤光素结合的蛋白质(E<sub>B</sub>)。

这种生物发光系统由两个反应组成, 首先是借助萤光素酶的只产生“活性氧”O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的激活[反应式(14-31)]:



然后是激发:



这种生物光的发射光谱是宽而且无结构的,  $\lambda_B$  为 490nm,  $\phi_B$  为 0.03。

萤光素酶(E—Cu)是一个铜糖蛋白(分子量 300,000), 人们推测: 在产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 时, Cu 发生了单电子的氧化。大多数类型的超氧化物歧化酶都是 Cu—Zn 酶, 人们相信它们均以类似的方式起作用<sup>[9]</sup>。

人们对其它过氧化物系统的研究都不如对 *Pholas* 的研究。*Chaetopterus* (毛翼虫属)的萤光素也是与蛋白相结合的, 像 *Pholas* 一样, 加 Fe<sup>++</sup>、过氧化氢和氧能产生化学发光<sup>[4]</sup>。柱头虫属系统 (*Balanoglossis*) 和蚯蚓系统行为也是类似如此, 只是它们的萤光素是小分子, 例如蚯蚓萤光素的分子量大约是 300, 它的萤光素酶也是铜蛋白<sup>[10]</sup>。

## 14.9 低水平发光 生物的化学发光

虽然我们一直在讨论光发射、化学发光和量子产额这些

术语,但我们还没有研究使这些量得以精确测量的一个重要器件,这就是光电倍增管(1.4.3)。它是一个在前窗内表面上涂有光敏阴极的真空管器件,光阴极吸收一个光子后发射出一个电子,然后电子被一个电压梯度吸引到一系列发射电子的倍增极上,这些用银-镁合金制成的倍增极具有很低的功函,当一个电子打在倍增极表面时,就会击出另外两个或更多个电子,这些电子被正电压吸引到下一个倍增极上并再次倍增,如此下去,经过 10 个或更多个倍增极,最后阳极输出一个  $10^6$  或更多电子的脉冲,它是一个负的电流脉冲,对应于最初打到光阴极上的一个光子。

光电倍增管主要作为电摄像机的“眼睛”和用于核物理工作中的闪烁计数而于本世纪 40 年代初期问世的,从那时起,光电倍增管制作的对光越来越敏感,并且具有很宽的光谱灵敏度。现在已经可以制造出能探测从大约  $1\text{cm}^3$  体积中的化学反应所发出的少于 100 光子/秒的光电倍增管。这意味着对于  $\phi_c$  低于  $10^{-17}$  的快速反应将可以测量到它们的发光。人们已经观察到大量的放热化学反应和许多生物体系确实发出很低水平的光。

人的眼睛也是非常好的光探测器,在灵敏度上与光电倍增管差不多,但是精度不够。因此几百年以来,人们就已知道许多化学反应都有微弱的光发散。许多研究者,特别是苏联的一些科学工作者,在 20 世纪 30 年代揭示了各种生命物体也能给出很弱的可见发光和紫外发光<sup>[11]</sup>。此后,他们利用盖革管进行探测,这种发光有时叫作有丝分裂中发生的辐射,或者叫作 Gurvich 辐射(因为 Gurvich 发现了这个现象)。这种发光通常与迅速生长的或呼吸旺盛的细胞相联系,如洋葱的根尖,正在分裂的酵母细胞,白血细胞(白血球),肝脏的线粒体和微粒体,正在收缩的骨骼和心脏肌肉等等<sup>[11,12]</sup>。

为了把这种低水平的发光与我们前面所讨论的发光相区别,我们把它叫作“生物的化学发光”。与大多数生物发光不同,在生物发光中光是起着一定的生物功能的,如萤火虫是用它作为通讯的,而生物的化学发光对这些生物没有明显的用处,它也许只是在一个绝对放热的反应中积累在某一激发态的产物分子以不可避免的麦克斯威尔-波尔兹曼几率浪费掉很少量能量的结果。另一方面,它可能是一种只在小范围内出现的非常有效的化学发光反应。在生物的化学发光中,似乎涉及到氧和自由基中间产物。

我们可以通过从一个有功能的生物单元即单个细菌或高等生物的一个细胞器发射的光更好地比较生物发光和生物的化学发光,一般来讲每个发光细菌发射  $10^2-10^3$  光子/秒,而 *Renilla* 的一个发光颗粒能产生峰值强度大约  $10^2$  光子/秒的闪光,可能含有上千个细胞器的双鞭甲藻在受到刺激时,每个甲藻将给出  $10^8$  以上的光子。与此相反,迅速呼吸的线粒体和正在进行吞噬的白血球具有的发光水平平均来说远远小于每个机体每秒钟一个光子<sup>[12]</sup>。实际上,生物发光和生物的化学发光的区别被这样的一个事实弄模糊了:所谓发光细菌的“暗”突变体都是非常之暗的,因为这种突变体所发出的光相当于野生型千分之一左右,也就是说它是在可以看成生物的化学发光的水平上的发光。

关于生物的化学发光机制了解的不多,但由于脂和其它不饱和烃的氧化引起效率低的化学发光,因此人们提出这种过程可能是生物的化学发光的基础。这种发光需要分子氧,往往可以通过加入过氧化氢来刺激。以烃的链式氧化为基础的一种机制是:





$(\text{RO})^*$  是一个激发的酮, 上述反应中各物质的荧光产额极低, 从而使总的光产额很低。

## 14.10 生物发光的起源和功能<sup>[4,13-17]</sup>

一般认为, 在原始地球上生命是产生于还原性极强的大气中, 即当时的大气中含有甲烷和其它的碳水化合物、氨、氢等等。而氧的浓度可能相当于现在浓度的千分之一, 当时氧的浓度是靠高能紫外线 ( $\lambda < 180\text{nm}$ ) 对水的光解来维持的。有生命的机体必须通过氧化、首先是通过容易氧化的化合物的氧化来获得自由能, 让我们把其中的一种易氧化的化合物叫作  $\text{AH}_2$ ,



于是使具有较低还原电位因而在能量标尺上位置升高的  $\text{BH}_2$  积累起来, 这样下去到了某一个时候, 生命机体就不得不利用很难氧化的碳氢化物, 但这是通过利用极活泼的氧自由基和羟自由基 ( $\text{HO}^\cdot$ ) 做到的。



正如上节所讨论过的<sup>[13]</sup>, 这些反应可以产生生物的化学发光。

生物发光起源的另一个理论是基于氧对于原始厌氧生物的毒性<sup>[1,4]</sup>。随着自然界的不断进化, 特别是在以水为基础的光合作用出现以后, 环境中氧的水平才开始上升。这个变化对于厌氧生物来说是不适宜的, 因为这些厌氧生物通过像



(14-36) 式那样的反应而产生有毒数量的  $H_2O_2$  和  $O_2^-$ , 然而, 由于产生了能把氧直接还原为水而不产生高反应性的中间产物的突变体, 使存活率提高了。这就需要排除大量过剩的可以以光的形式方便地辐射出去的能量。生物发光反应都是在很低的氧浓度下进行得好, 这种浓度可以大大低于维持需氧生物生长所需要的水平。但是这个事实同样好地支持着上述两个理论。

直到进化产生了视觉过程以后才有产生一些光效率很高的生物发光反应的需要。该过程的第一阶段是用高荧光的受体分子去有效地敏化化学发光过程, 我们在细菌和腔肠动物系统中看到的就是这个机制在起作用。如果进化程度较高, 那就会对这些反应加以选择, 选择那些将直接产生荧光强的处于激发单线态的产物分子的反应。这就是萤火虫、海萤和其它较高级生命形式的发光机制。

从功能的观点来看, 对萤火虫的研究最多, 同时也了解的最清楚。萤火虫的闪光是一种性信号, 其实它是由一系列精心结构的闪光组成(图14-7), 它是反映萤火虫品种特征的“莫尔斯密码”。飞行着的雄性发出闪光, 然后在大约 2 秒钟的一段时间间隔后, 收到雌性的回答。有一种食虫的雌性萤火虫, 它能够模仿捕获物雌虫的响应来引诱它的捕获对象。

近来发现, 在加以控制的实验室条件下, 用发光和不发光的双鞭甲藻以及捕食它们的天敌组成的混合群体实验, 结果发光型的双鞭甲藻的存活率超过了不发光的类型。可能是发亮的闪光引起了天敌的逃避反应, 因此给了具有这种发光性质的双鞭甲藻生存的能力<sup>[16]</sup>。在虾、尤鱼和海萤中也发现了其它的逃避性闪光, 但是人为控制的研究进行的很少。

某些发光的鱼有一个发光的器官, 它是共生繁殖起来的发光细菌。有些鱼甚至有一个盖子在发光器官上移动, 从而

使连续的发光变成为闪光。另一些鱼似乎有一个与海萤一样的发光系统,即萤光素和萤光素酶的交叉反应,发光可能是作为一种求偶的信号或是诱饵。

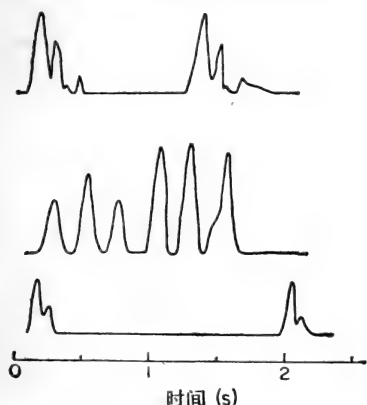


图 14-7 活的萤火虫的闪光序列。上图: *Photinus gracilobus*; 中图: *Photinus melanuris*; 下图: *Photinus nothus* (根据参考文献 [14]重新绘制)。

在澳洲有一种发光虫,它是双翅类(蝇)的幼虫,与美洲鞘翅类的萤火虫(甲虫)不同,它的发光具有诱饵的功能。这种幼虫悬挂在蜘蛛网的正中,发出蓝光( $\lambda_B 490\text{nm}$ ),小的飞虫被这种蓝光吸引而落入蜘蛛网并被吞食。

因此,生物发光似乎是一种附属的适应性生物化学发光。其功能对别的发光生物来说也类似前面所描述的那些生物,都是

为具有发光能力的生物服务的。H. H. Seliger 把所有物质中生物发光的功能归结为八个字: 猎食、防御、求偶(如萤火虫的通讯联络)和欺骗(如食虫的萤火虫)。

### 14.11 生物发光反应的应用<sup>[1,18]</sup>

由于制备的成本昂贵和难于长期储存酶,所以用生物发光反应去提供照明是不实际的。然而,一些高效的化学发光反应已被广泛地利用作为紧急光源。生物发光反应的一个真正重要的应用是测定和分析有关的或者能够与生物发光反应偶联的辅助因子。例如用萤火虫的反应来分析 ATP<sup>[19]</sup>。用

细菌的生物发光反应来分析还原的辅酶 I(NADH) 和 FMN 的方法以及用水母光蛋白检测  $\text{Ca}^{2+}$  的方法都是仍然有待全力开发的潜力很大的应用。

对非常少量的 ATP, 萤火虫化验法实际上是唯一可行的方法。如果在萤火虫的萤光素和萤光素酶的溶液中加入一定量的 ATP, 则产生一个闪光。如果用一个与电流表和记录仪相连接的光电倍增管进行探测, 可得到如图 14-8 所示的曲线。当用光强度的最大值  $I_0$  对加入的 ATP 的量作图时, 得到

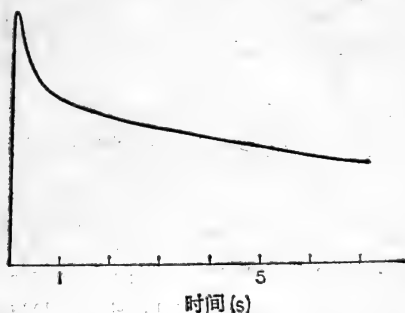


图 14-8 把 ATP 注射到萤火虫的萤光素酶和萤光素的混合物中所得到的体外的萤火虫生物发光的闪光。对  $10^{-9}\text{g}$  的 ATP, 闪光的最大高度 ( $I_0$ ) 大约相当于  $10^{10}$  光子/秒。

一条直线, 这就是标准曲线(图 14-9)。对一个未知样品, ATP 的含量可以由它的  $I_0$  计算出来。这个方法已被用于测定神经细胞、植物种子和细菌中 ATP 的含量, 用酶的偶联对方法作的改进能够分析其它重要的辅助因子, 如 AMP、环化 AMP 和焦磷酸盐。可以测定利用 ATP 的酶, 如肌酸磷酸激酶。然而, 生物发光反应最重要的应用之一是通过 ATP 的含量来测定与 ATP 直接有关的生物集团。例如, 在医院的化验室里, 可以用这个方法迅速测量血样和尿样中的细菌的感染水平。

NADH 的测量是比用细菌生物发光反应直接化验 FMN

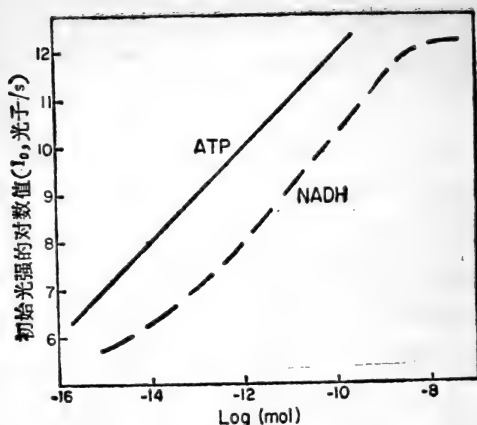


图 14-9 用萤火虫的生物发光系统测定 ATP 的标准曲线, 和用细菌生物发光系统测定 NADH 的标准曲线。

更为广泛的应用。在生物发光细菌的浸出原液中存在着一个酶, 它能用 NADH 还原 FMN。

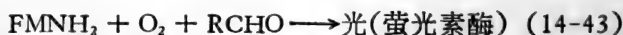
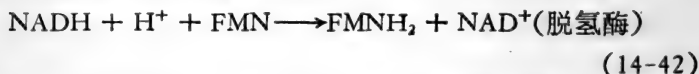


图 14-9 给出用这样一个混合酶体系得到的  $I_0$ 。许多在临床上有意义的酶都是通过它们与 NADH 的反应来测定的, 但是用于这种工作的生物发光方法还有待发展<sup>[18]</sup>。

用水母发光蛋白与  $\text{Ca}^{2+}$  的反应能够测定低于  $10^{-13} \text{mol}$  的  $\text{Ca}^{2+}$ 。尽管这种反应对  $\text{Ca}^{2+}$  特别灵敏, 但其它离子如  $\text{Sr}^{2+}$  在比  $\text{Ca}^{2+}$  高 100 倍的浓度下也能引发这个反应。许多生理过程都涉及到  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的迅速变化, 因此在研究诸如肌肉收缩时  $\text{Ca}^{2+}$  的瞬时浓度时, 可以利用这种水母发光蛋白的反应<sup>[22]</sup>。

终于, 使用像增强管实现了另一种性质不同的应用, 当把像增强管接到显微镜上时, 可揭示出在整个生物机体内生物

发光的部位和时间响应。这种方法使我们能够看见单个双鞭甲藻上的神经冲动，并且能使我们在显微镜下确定某些腔肠动物中发光细胞的位置<sup>[23]</sup>。

## 14.12 实 验

用不着精巧的实验室设备就可以进行一些简单的演示。可以用萤火虫的反应演示 ATP 的分析、对氧的需求和 pH 对发光光谱的影响<sup>[14,19]</sup>。利用发光的细菌可以演示氧效应和 NADH 的反应。用黑暗中适应的(约 10 分钟)眼睛能够看到光发射,但是对一些比较定量的测量则应该采用某种光度计,如关上激发灯的荧光光度计、或是不工作在符合方式的闪烁计数器。如果学生有冷冻离心机和 pH 计,则可做一些定量的实验。

萤火虫很容易捕获到,或者可以从几家化学供应公司(华盛顿化学公司,西格马化学公司)得到完整的干萤火虫。取 10 个左右的干萤火虫,切下尾部,然后用大约 1g 干净的砂子和 3ml 缓冲液研磨切下的尾部。缓冲液是用 0.4 g 甘氨酸和 0.1g 碳酸氢氨溶解在 100ml 蒸馏水中制成的。溶液最终的 pH 约 7.6。应该研磨 10 min 左右,然后将溶液过滤(若有条件最好离心)。滤液即为粗提取液。上述全部操作均需在 0℃ 下进行。将粗提取液分成三份装在试管中。在 100ml 缓冲液中溶解 0.1g 的 ATP 再加入 0.01g 硫酸镁(或其它的可溶性镁盐)制成 ATP 溶液。所有的光反应必须在室温下进行。向第一份提取液中迅速加入 1ml ATP 溶液,则可看到黄色闪光。

分别向 1ml ATP 溶液及第二份萤火虫提取液中鼓氮气约 5 分钟,然后在继续鼓氮气的条件下,迅速将两种溶液混合。因为氮气把氧气从溶液中赶走,因此只有在空气中搅拌几秒

钟才有足够的氧气返回溶液而引起发光。将一滴 10% 的浓醋酸加到 1ml ATP 溶液中,然后把此溶液加到第三份提取液中,于是应该观察到弱的红光(见图 14-2)<sup>[4]</sup>。

培养的发光细菌可以买到,另外一种办法是从腐烂的鱼或鱿鱼的表面分离出一种野生型菌株。可以用标准的微生物技术把这些细菌接种到佩特里氏培养皿中并使之生长。培养皿内盛有消毒的培养基,其成分如下: 100ml 培养基内含氯化钠 2.5g, 磷酸钠 0.5g, 磷酸氢二钾 0.2g, 磷酸氢二氨 0.05g, 硫酸镁 0.01g, Bacto-蛋白胨 (Difco) 1g, 甘油 0.3ml, Bacto-琼脂 1g。混合物的最终 pH 约 7.3。大约接种后 3 天,培养皿表面应该覆盖着一层生长着的发光细菌,如果向佩特里氏培养皿中通氮气,并尽可能盖严培养皿盖子,则发光明显地暗下去,而当重新暴露空气时,则又恢复到原来的发光。

细菌的萤光素酶也可以从上面提到的化学公司购买。在 10ml 缓冲液中溶解 0.1g 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸制成还原的 NADH 溶液。另一个黄素单核苷酸 (FMN) 溶液是用 1000ml 水溶解 0.05g FMN 制成,然后配制十二烷醛在水中的悬浮液,即在 10ml 缓冲液中加一滴十二烷醛,剧烈摇动 1—2 分钟,便得到十二烷醛的雾状悬浮液。取 2mg 细菌萤光素酶在试管内溶解于 1ml 缓冲液中,然后加一滴十二烷醛悬浮液,一滴 FMN 溶液,在暗室中再加一滴 NADH 溶液,将能看到蓝色闪光,虽不如萤火虫的闪光亮,但能在数分钟内维持稳定的发光。

(张茵译 沈恂校)

# 第 15 章 光生物学的新课题

Kendric C. Smith

(斯坦福大学医学院放射系)

15.1	序言 .....	480
15.2	常见的关于光的错误概念 .....	480
15.3	不透明物体的吸收光谱 .....	482
15.3.1	光透过人体组织 .....	483
15.3.2	光透过植物组织 .....	484
15.3.3	光声光谱学 .....	485
15.4	环境照明对动物及人的影响 .....	486
15.5	光生物学中的免疫学 .....	487
15.5.1	体内胸腺嘧啶光产物的免疫学测定 .....	487
15.5.2	紫外线诱发皮肤癌的免疫学 .....	488
15.6	酶的光激活 .....	489
15.6.1	酶-底物复合物的光激活 .....	489
15.6.2	通过产生酶的构象变化而造成的光激活 .....	490
15.6.3	通过从关键的氨基酸中排除阻塞化合物使酶光激活 .....	490
15.6.4	酶通过光产生其底物而被光激活 .....	491
15.6.5	通过光致变色抑制剂的异构化引起酶的光激活 .....	491
15.6.6	用可见光照射结晶形式的底物来提高酶的活性 .....	492
15.7	近紫外辐射和可见光(有害的效应) .....	492
15.7.1	200—700nm 间的杀菌作用光谱: 一种解释	

.....	492
15.7.2 近紫外辐射 (300—380nm) .....	494
15.7.3 可见光 .....	495
15.7.4 结论 .....	496
15.8 不同波长辐射的非相加效应(协同作用和对抗作用)	
.....	497
15.8.1 协同作用 .....	498
15.8.2 对抗作用 .....	499
15.9 用光做为选择工具 .....	500

## 15.1 序 言

在作者看来,重点地回顾一下光生物学的新课题或是光生物学校老分支领域里的新进展,是想请读者注意光生物学里的那样一些领域,它们将为未来的激奋人心的研究提供极好的机会,在以前各章的结论部分也给出了一些有关这方面的新的例子。

乍一看来,关于光的错误观念的 15.2. 节似乎不在题为“光生物学的新课题”这一章的范围之内,其实不然,长期以来,对光的性质的一些错误观念妨碍了光生物学的发展。例如,假若人们错误地认为光不能穿透人体,那么除了视觉、皮肤癌的诱发和维生素D的合成的研究之外,光对人体的影响似乎再也没有可研究之处了。然而,一俟这个错误观念被澄清后,光对人体影响的研究(如:酶的激活、激素水平的变化等等)就变成光生物学最引人入胜的新课题之一。

光生物学是一个令人迷恋的领域,人们至少可以从两个不同的角度来探索它:①只研究光对生物系统的有利和有害的影响;②当了解了光对生物系统影响的一些情况后,人们就能利用光做为一个选择工具来研究或治疗疾病。下面将给出这两方面的一些例子。



## 15.2 常见的关于光的错误概念

甚至在科学家和医生当中也存在着对光的特性的一些共同的错误概念。人们可以把这些错误概念看成是一类“荒唐故事”，起初，这些错误似乎很可笑，但是当人们认识到正是由于这些错误概念阻碍了光生物学的发展时，它们就不再是可笑了。

错误 1：由于可见光的光子能量太低，就以为可见光不像紫外线那样能引起光化学反应。这种错误观念的产生可能是由于紫外线一般比可见光容易使生物系统钝化，这个结果并非由光的性质所致，而是由其光化学变化导致生物系统钝化的那些吸收光的分子的特性造成的。

因此，由于 DNA 是细胞内最重要的分子，并且它能由于吸收紫外线而改变，所以细胞最容易被紫外线杀死。假若 DNA 的电子结构适于吸收蓝光而不是紫外光的话，那么细胞就最容易被蓝光所杀死。因此人们应该记住，在适当条件下可见光如同紫外辐射一样能引起光化学反应。

错误 2：可见光是天然存在的，因此它是安全的。这是上一个错误概念的变种，因为某些事物是天然存在的这一点丝毫应该使这么想的人产生安全感，毒蛇和有毒的植物都是天然存在的，但它们绝对不是“安全”的。

可见光或甚至紫外光，假若它们不被吸收，也完全是安全的。安全不是光的波长所固有的特性。蓝光对核酸是“安全”的，因为它不被核酸所吸收，而对胆红素就是不安全的（参阅第 7 章）。在一定的条件下，“天然”的可见光是相当有害的（参阅 15.7.3）。

错误 3：因为可见光不穿透人体组织，所以我们不必关心可见光的生物效应。由于人们不能看透他（她）的手，就产生

了光是不能穿透手的这一错误概念。实际上,有相当大量的光是透得过人手的,这在 15.3.1 中将给以证明和讨论。鉴于光能透过人体组织并被吸收,因此关心它们的生物效应是理所当然的。

错误 4: 水是一种很好的紫外线过滤器。下面的事实将能轻易驳倒这一错误观念。事实是即使在阴天,太阳的大部分热和大量可见光均被云层滤掉后,但人们仍能被晒黑。这是因为太阳的紫外辐射通过云层后只减少了 50%<sup>[1]</sup>。最近有人综述了关于阳光透过天然水的数据<sup>[2]</sup>。

错误 5: 由于到达地球表面的太阳紫外辐射(波长小于 320nm)的量不到射在地球表面的太阳总辐射量的 1%,因此在考虑太阳光的生物效应时,可以忽略太阳的紫外辐射效应。这个错误观念起因于人们往往忽略掉均匀样品中很小百分误差的一般经验,但是太阳光不是一个均匀样品,每个波长的光(从紫外到可见光)只要被吸收,则具有同样的机会产生光化学变化。因为所有的活细胞都含有 DNA,当不加光敏化剂时,紫外辐射杀死细胞的效力要比可见光大几个数量级。这点已为不同波长光的杀菌效率的作用光谱证明了(15.7.1)。虽然,波长短于 320nm 的紫外辐射不到太阳总输出能量的 1%<sup>[3]</sup>,但它却构成了太阳光有害生物效应的 99% (15.7.1)。显然,这 1% 是绝不能忽略的。

### 15.3 不透明物体的吸收光谱

不透明是个相对的量,它是基于人类视力的很有限的光谱范围。这个范围大约从 380nm 到 700nm,且在 550nm 附近有一个效率峰值(图 1—2)。因此,难于透过 380—700nm 之间的光的物体被认为是不透明的。同样,若一个物体很容易

透过波长小于 380nm 或大于 700nm 的光,它仍被认为是不透明的。因为我们的眼睛对这些波长的光是没有反应的。

这种基于人类视力的十分局限的不透明观点,妨碍了人们思考光对不透明系统的可能的生物效应,阻碍了光生物学的某些领域的进展,特别是人的光生物学的进展。

### 15.3.1 光透过人体组织

因为我们一般不能看透人体,所以产生了一个共同的错误观念,即光除了可以穿过眼睛外,是不能穿透人体的。面对这种错误的说法,我不禁要问这个人是否曾玩过一种小孩子的游戏。在一间黑屋子里,站在镜子前面,把闪光灯的亮端放进他(她)的嘴里。这个游戏证明了光确实能透过活组织,透过的主要是红光(670—760nm)。

在“科学的美国人”杂志 1972 年 3 月刊的封面上可以看到光透过人手的例证。仔细地挡住手指间的空隙,在手的一侧开启闪光灯,在另一侧可摄下由透射光所产生的红色手的彩色照片。

光穿过人手的更加艺术性的例证是挂在巴黎卢佛尔博物馆内的乔治·德·拉·吐厄(1593—1652)所画的一幅油画。在这幅题为“圣·约瑟夫木匠”的画中,一个小孩用她的手挡住蜡烛的光,而画上表明光是透过手指组织的。

“不透明”的生物样品的吸收光谱是可以记录的,只需将样品紧靠在光阴极上<sup>[4]</sup>,然后用非常灵敏的分光光度计进行记录。人手的吸收光谱(图 15-1)表明人手对波长在 650nm 到 900nm 之间的光是相当透明的。光密度为 3.5,大约相当于 0.05% 的百分透射率(%T)。因此,我们是否能看到透过活组织的红光,在一定程度上依赖于入射光的强度  $I_0$  [ $\%T = I$  (透射的)/ $I_0$ ]。

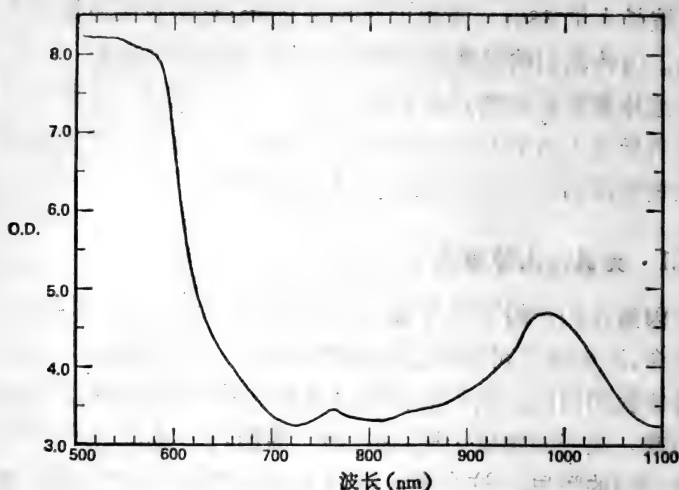


图 15-1 人手的吸收光谱。这个光谱是把手靠在光阴极上用最灵敏的分光光度计记录下来的。(Karl H. Norris 的未出版的资料)。

类似的例证是用闪光灯和照相机可以查明婴儿的脑积水<sup>[5]</sup>,所谓脑积水就是脑脊髓液部分代替了正常脑组织。内科医生只需将患者置入黑房间内,然后用闪光灯观察婴儿头部的透射情况即可确诊。因凡脑组织被脑脊髓液代替的部分,光就很容易穿透。

当光被吸收时,便产生光化学反应!因此,由于光能深深地穿入人体组织,人们不禁要问:其生物学后果如何呢?

我们知道在低等动物和鸟类中有眼球外的光感受器(第9章)。但是人们正在研究在人身上有无可能有这种光感受器。假如人身上也有眼球外的光感受器的话,这将大大地影响我们现在只是以对视觉最佳的关于人工照明的概念。

### 15.3.2 光透过植物组织

关于不透明物体的吸收光谱学是研究植物学的有力工

具。它不仅已作为工具用于光合作用、光节律和光形态建成方面的研究<sup>[6]</sup>，而且在农业上用于测量水果、蔬菜的内在质量和鸡蛋的分级<sup>[7]</sup>。

### 15.3.3 光声光谱学

光声光谱学技术是以十九世纪八十年代 Alexander Graham Bell 和其他人的实验为基础的，这些实验表明，从周期性间断地照射气体的光中吸收的能量能够使一个封闭小室的气体压力产生波动，这个波动可以作为听得到的声音被探测到。人们对气体已经透彻地研究了这种效应，但对固体的类似效应至今尚未充分研究。

对固体光声光谱学来说，样品放入装有适当气体和一个灵敏话筒的小室内，然后用周期性间断的单色光照射样品，被固体所吸收的任何光将在固体内部通过无辐射退激过程全部或部分地转化为热。由于周期性间断的光对固体周期性地加热，于是所产生的从固体吸收体流向周围气体的周期性热流就使小室内的压力产生波动，这种波动可用话筒进行探测。从话筒得到的模拟信号可以做为入射光波长的函数记录下来。倘若在所吸收的光能的逸散中无辐射过程占支配地位，那么光声的光谱至少定性地对应于固体的吸收光谱。

光声光谱学的主要优点在于它能使人们对任何类型的固体或半固体物质得到类似于它们的吸收光谱的谱，不论这种物质是晶体、粉末，还是无定型的、粘稠的物质或胶体等等。另外，用普通光谱学技术对许多固体物质（如生物样品）进行研究时，遇到的最严重的问题是光散射，而这点在光声光谱学中不存在任何困难，因为光声光谱学中只有吸收的光才转化为声音。

光声光谱学已用来研究束缚在膜上的细胞色素  $P_{450}$ 、绿

叶、不透明的肌红蛋白晶体和全血中血红蛋白,在诸如牙齿和骨骼这些硬组织的研究中应该能找到它的应用。此技术已被用于探测和鉴别薄层色谱板上的斑点,并被用来演示一种抗菌剂在豚鼠皮肤中的积累。它可以在几分钟内给出复杂生物系统内存在的化合物的情况,并且只需要几毫克的材料,不需任何特殊的样品制备。在不久的将来,光声光谱学必将在不透明的生物材料的吸收光谱的研究中获得更广泛的应用<sup>[8]</sup>。

## 15.4 环境照明对动物及人的影响

光(它的强度、波长分布及周期性)可能是我们环境中最重要的因素之一。但它对人的影响却研究得很少。在温度对人的影响(极地和沙漠的探险)及压力对人的影响(高空和深海的探险)方面已做了相当大量的研究工作。除昼夜节律的研究外(即光的周期的影响,参阅第8章),环境照明对人类的影响几乎没有开展多少研究工作。

同样,也几乎没有研究过环境照明对实验动物的影响,下面是 Fouts 博士在最近召开的题为“影响实验动物的环境和遗传因素——对生物医学研究的冲击”讨论会的展望中讲的一段话<sup>[9]</sup>:“虽然已经谈到了照明,但主要是从照明时间的长短和周期循环方面谈的。白炽灯光或荧光灯光的亮暗有没有什么关系? 什么波长的室内照明具有生物活性? 对这些问题的某些方面已经做了不少工作(例如光对松果腺氨的调节作用)。但是,更普遍的效应尚未充分研究(例如非硫氰酸盐的受体的药物代谢、吸收、分布、排出和反应性)……。因此,影响实验动物反应的环境和遗传因素这个领域将是未来生物学研究最振奋入心的领域。它的魅力在于以下几方面。(1) 环境条件和遗传组成中的微小变化将会在动物的反应上产生很

大的变化。(2) 目前已经查明的,或过去相当定量地查明的也只是部分环境和遗传因素对实验动物的影响。(3)系统地研究这些变化的因素不仅可以得到动物模型与人类中存在的生理或病理状态之间的密切联系,还可能发现新的生物学原理”。

人们仅希望 Fouts 博士对环境照明给实验动物的影响这一问题上所表现的关切,将引起所有使用实验动物的科学家们的普遍关心,因为这会给我们在设计对人的环境照明时提供很有价值的信息。

目前已有关于各种照明疗法对植物、动物和人类的奇妙作用的报道<sup>[10]</sup>。如果所观察到的奇妙作用能获得证实和进一步研究,那将是非常有意义的。

## 15.5 光生物学中的免疫学

近来,免疫学这个领域受到人们空前的重视,这是由于受到器官移植技术的发展,自身免疫性疾病的发现和相信免疫学技术可能提供治疗肿瘤的方法等方面的刺激。

最近,免疫学家对光生物学作出了一些重大贡献。将来,免疫学技术应用于光生物学问题的研究可能是很有前途的领域。

### 15.5.1 体内胸腺嘧啶光产物的免疫学测定

用免疫学方法探查和定位受紫外线照射的动物(包括人)皮肤组织中损伤的 DNA 是一个有效的新方法。例如,含有对紫外照射的 DNA (抗原) 专一性作用的抗体的兔子抗血清能与紫外照射的动物皮肤组织中损伤的 DNA 发生反应。这些特殊的抗原-抗体复合物在与抗兔子 $\gamma$ -球蛋白的结合了荧光素的羊抗血清反应后,可以用显微镜进行观察(间接免疫荧光

技术)。

这种抗血清似乎对胸腺嘧啶光产物有很高的专一性,并且不和原来的 DNA 交叉反应<sup>[11,12]</sup>,它被用于探查在人皮肤中及培养的人细胞中紫外辐射所引起的 DNA 的损伤<sup>[13]</sup>。人们用这种技术追踪观察培养的人细胞中紫外辐射引起的 DNA 损伤的修复动力学<sup>[12]</sup>。现在已经得到了在小鼠皮肤中产生紫外辐射诱发的细胞核损伤的一个大致的作用光谱<sup>[14]</sup>。

这个技术的潜力很大,可用来定量测定产生 DNA 损伤的不同波长太阳辐射的穿透深度。很可能这种研究同样可以用于植物(就像用于动物一样),如果人类的活动使同温层的臭氧层受到扰动,这种研究应该能提供有关这个可能的有害反应问题的有价值的信息。

对紫外线辐照和照射后修复后细菌和哺乳动物细胞中胸腺嘧啶二聚体的血清学测定,人们建立了一种灵敏的放射免疫测定法<sup>[15]</sup>。 $5\text{J}/\text{m}^2$  的紫外辐射所产生的胸腺嘧啶二聚体很容易被测出,它比色谱技术要灵敏。

### 15.5.2 紫外线诱发皮肤癌的免疫学

慢性紫外照射在小鼠中诱发的大多数皮肤肿瘤都是高度抗原性的,这些肿瘤(主要是纤维肉瘤)当被移植到正常的小白鼠上时,常常是被免疫排斥的,虽然它们可以在免疫抑制的遗传性状相同的(同基因的)小鼠(例如对 3—4 周龄的小鼠将其胸腺切除后两周,给予  $450\text{ rad}$  全身照射。)身上生长,这就提出了一个重要问题,为什么这些高度抗原性的肿瘤能够在它们原来的宿主身上存活并逐渐生长。

近来在一系列使人兴奋的关于紫外辐射诱发致癌的免疫参数的实验中对这个问题进行了研究<sup>[16]</sup>。虽然正常的同基因小鼠排斥移植的紫外线诱发的肿瘤,但是背部受紫外线照射



的动物却不排斥在腹部植入的肿瘤,因此,除了在照射部位有致癌作用外,慢性紫外线照射还会引起系统性的变化,这种变化阻止了对这些肿瘤的免疫学排斥。于是,人们说明了紫外照射对动物的一个新的效应,这个新的效应对于我们如何看待过度接受阳光曝晒的问题也许有深远的影响。

除此之外,产生了一个很吸引人的可能性(它还有待检验),即这种紫外线诱发的系统性的变化可能还会影响在病毒或化学致癌过程中宿主和肿瘤之间的平衡。这种可能性肯定是值得进一步研究的。

## 15.6 酶的光激活

光激活的酶可能构成了一类对控制生物功能很重要的光受体,人们已经提出:一种催化小的底物分子向效应产物转化的酶的光激活将通过变构控制酶的相互作用而引发一连串酶的激活<sup>[17]</sup>。

酶的光激活无疑构成了光生物学的一个“新课题”,它将在今后的几年迅速发展,下面将介绍光可能影响酶反应的六种机制。

### 15.6.1 酶-底物复合物的光激活

当细胞中的 DNA 由于紫外辐射而形成环丁烷型的嘧啶二聚体时,在大部分细胞中存在的光激活酶就能与这些损伤部位相结合,如果这时用 320—410nm 左右的光照射这些酶-底物的复合物,则二聚体将劈开成单体,因此可见光和酶的联合作用可修复紫外辐射所产生的损伤。光激活酶(光解酶)是唯一一个已知的光在酶促过程中在酶-底物复合物水平上起重要作用的例子(5.4.2)。

### 15.6.2 通过产生酶的构象变化而造成的光激活

在组氨酸转化为谷氨酸的过程中,尿刊酸酶是一个重要的酶,从 *Pseudomonas putida* 得到尿刊酸酶可以被近紫外线( $\sim 360\text{nm}$ )激活。对细胞、细胞提取物和用凝胶电泳纯化的酶均存在这种激活作用。细胞提取物的光激活不需要氧且与温度无关( $0-40^\circ\text{C}$ )。光激活的作用光谱的主峰在  $275\text{nm}$  处,次峰在  $320\text{nm}$  处,它和尿刊酸酶的辅酶  $\alpha$ -丁酮酰的吸收光谱有某些类似<sup>[18]</sup>。然而,钝化这种活性酶的作用光谱对应于一个简单蛋白质的吸收光谱,它说明酪氨酸或色氨酸可能是钝化作用的发色团。把提纯了的这种酶的活化形式和钝化形式相比较,比较的结果说明尿刊酸酶因激活而发生轻微的构象变化<sup>[19]</sup>。当这种有活性的酶保存在暗处时,它会渐渐失去活性,但可以通过再照光而重新激活。但是酶本身的反应并不需要光。

### 15.6.3 通过从关键的氨基酸中排除阻塞化合物使酶光激活

一般商售木瓜蛋白酶必须加入还原剂二硫苏糖醇使之化学激活。激活反应需要把木瓜蛋白酶中第 25 位上的活性半胱氨酸残基所含的混合二硫键打开。木瓜蛋白酶也能被紫外辐射激活<sup>[20]</sup>,人们知道紫外辐射能够打开二硫键,事实上,二硫键是蛋白质里最容易起光化反应的基团(表 5-1)。当钝化的木瓜蛋白酶在氮气中用  $\lambda > 250\text{nm}$  的光照射时,木瓜蛋白酶暂时被激活,但随着照射时间的加长,则又出现钝化。如果在空气饱和的溶液中用紫外线照射具有部分活性的木瓜蛋白酶,则只发生钝化作用。闪光光解研究认为,紫外照射引起的木瓜蛋白酶的激活涉及到一个混合二硫化物光解;而钝化则涉及一个关键的色氨酸残基的光电离。

这种特殊的激活反应可能与生物的关系不大,但是它提供了一个用光来控制酶的可能的机制,也就是说用光化学方法来排除活性部位的封阻化合物。如果这种反应能由可见光产生,那么它就在生物学上很有意义了。这种反应的一个例子也许是菠菜和大麦叶子里 NADP-苹果酸盐脱氢酶的光激活,这个钝化的酶在体外可被二硫苏糖醇激活,在体内则可由可见光激活<sup>[21]</sup>,这个现象对阐明这种光激活反应的机制很有意义。

#### 15.6.4 酶通过光产生其底物而被光激活

当我们对从视网膜制备的外视杆段加  $Mg^{2+}$  和 ATP 培养时,视紫质被磷酸化,光大大加速了这个反应。光所起的作用可能是直接刺激激酶的活性,或是改变激酶的某些辅助因子的浓度,或是改变视紫质的构象从而使它成为激酶的底物。现已分离出蛋白激酶,并发现它只对光漂白的视紫质起作用,而对未漂白的视紫质、组蛋白、卵黄高磷蛋白或酪蛋白均不起作用<sup>[22]</sup>。因此,光漂白的视紫质看来是这种激酶的唯一底物。

当细胞受紫外照射时,也能通过光产生其底物的途径使一些酶光激活,在 DNA 中这样产生的一些光产物于是就成为许多 DNA 修复酶的底物(参阅第 5 章)。

#### 15.6.5 通过光致变色抑制剂的异构化引起酶的光激活

可以用对光敏感的酶的抑制剂来对一个本身对光不敏感的酶促过程进行光调节,例如,一个特殊的钝化剂或胰凝乳蛋白酶,对位偶氮苯二苯氨甲酰基氯(p-azophenyldiphenylcarbamyl chloride)均能以两种几何异构体即顺式和反式存在,这两种形式在光的作用下可以互相转化。当用 320nm 光照射时反式

可以转变为顺式，而用 420nm 光照射时顺式亦可转变为反式。顺式异构体作为酶的抑制剂比反式异构体的抑制效率高五倍，因此酶的钝化程度可以用光来调节<sup>[23]</sup>。光致变色剂也可用来控制乙酰胆碱酯酶的活性<sup>[24]</sup>。

虽然尚未分离出任何天然存在的光致变色的酶抑制剂，但光致变色物质在视觉（即视网膜中）和在光形态建成中（即植物光敏色素中）起着重要的作用。

### 15.6.6 用可见光照射结晶形式的底物来提高酶的活性

已有人报道，用可见光（ $\sim 400$  英尺烛光，546nm）照射结晶形式的酶底物能引起酶反应的增强，这个效应是周期性的，而且只在不连续照射时才产生。引起首次增强的最小照射时间（秒）和随后的增强之间的时间间隔（秒）取决于各种不同的酶<sup>[25]</sup>。这种现象是很独特的，并且也有不少争论。它有待其它人的普遍确认和提出一个能加以检验的看来合理的假设。

## 15.7 近紫外辐射和可见光（有害的效应）

### 15.7.1 200—700nm间的杀菌作用光谱：一种解释

图 15-2 中所示的杀死大肠杆菌的作用光谱表明：从 200—700nm（即远紫外、近紫外和可见光）都能杀死细菌，虽然不同波长的杀菌效率的变化能差到几个数量级。

220—300nm 是最有效的杀菌范围，它与 DNA 的吸收光谱是相关联的<sup>[26]</sup>。在这个波长范围内的重要反应是直接吸收辐射而使核酸的碱基从其基态 ( $S_0$ ) 跃迁到第一激发单线态 ( $S_1$ )。

分子通过直接吸收光从其基态跃迁到三线态的机率尽管很低（即“禁戒跃迁”），但仍然是可能的(2.3.6)。对于核酸，这

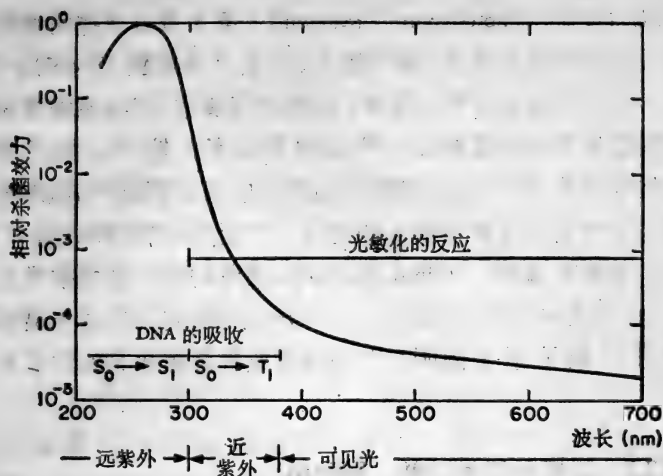


图 15-2 大肠杆菌的致死作用光谱 (由参考文献 26 改编) 及对不同类型光化学反应的波长范围的标本。详见本文。

种情况发生在 300—380nm 波长范围<sup>[27]</sup>。这种跃迁(即  $S_0 \rightarrow T_1$  的跃迁)的机率大约是  $S_0 \rightarrow S_1$  的跃迁机率的  $10^{-6}$ , 这或许可以解释为什么在细胞里产生同样数量的胸腺嘧啶二聚体, 在 365nm 波长上所需的能量大约是 254nm 时的  $10^6$  倍<sup>[28]</sup>(注意:  $(S_0 \rightarrow T_1)/(S_0 \rightarrow S_1)^*$  的比值为  $10^{-6}$  可以由磷光的辐射寿命/荧光的辐射寿命的比值计算出来, 这个比值正比于吸收系数, 即激发的几率正比于退激的几率)。

从 300—700nm, 光敏化反应(参阅第 4 章)在细菌钝化中可能起重要作用。这种钝化是由于发色团而不是核酸吸收光能所引起的, 但这个光能在许多情况下随后将传给核酸, 从而导致了细胞的死亡。

在 313—650nm 范围内出现与氧有关的致死, 虽然 460nm 以下还有与氧无关的致死<sup>[29]</sup>。与氧有关的反应在分类上叫做

\* 原文中此式为  $(S_0 \rightarrow T_1)/(S_0 \rightarrow T_1)$ , 分母中的  $T_1$  应为  $S_1$ 。——译者

光动力反应 (photodynamic reaction) (第 4 章), 一些可能的天然敏化剂包括核黄素、维生素 K、黄素单核甙酸 (FMN)。

经过由酮类 (例如丙酮) 引起的三线态-三线态能量传递可以发生不依赖氧的反应<sup>[30]</sup> (3.8 和参考文献 27), 由内源光敏化剂和可见光引起的 DNA 加成反应尚未研究<sup>[31]</sup>, 但对外源光敏化剂例如呋喃香豆素却进行了广泛的研究(4.4.1)。

虽然在 220—300nm 范围内, 杀菌的作用光谱很类似于 DNA 的吸收光谱, 但是 300—700nm 范围内的作用光谱的形状将依赖于系统内所存在的内源或外源敏化剂的性质和数量。

## 15.7.2 近紫外辐射(300—380nm)

近紫外辐射仅处在蛋白质和 DNA 吸收区的边缘, 但它仍会产生许多通常由远紫外辐射 (即波长低于 300nm 的辐射) 引起的有害效应, 例如致死、诱发突变和生长延迟, 但发生这些效应需要相当高的辐射剂量<sup>[32,33]</sup>。在这些效应中, 抑制生长 [即降低幼苗期的生长速率, 或者暂时完全停止生长(生长延迟)] 的效应所需近紫外辐射的剂量最低。

### 15.7.2.1 生长延迟

对细菌的研究表明, 延迟生长有一个峰值在 340nm 的狭窄的作用光谱, 早期认为一些醌可能是发色团而氧化磷酸化可能是细胞的靶子, 但一直没有被证实。最近, 已证明在大肠杆菌中引起生长大大延迟的近紫外辐射的剂量造成 RNA 净合成的完全(但是暂时的)停止, 但是对蛋白质合成和 DNA 合成的影响却没有那么严重。抑制 RNA 合成的作用光谱和延迟生长的作用光谱相同, 并且很接近于含有少见的 4-硫尿嘧啶碱基的 tRNA 的吸收光谱。体外研究表明, 近紫外辐射在

tRNA 中的第 8 位上的硫尿嘧啶和第 13 位上的胞嘧啶之间产生一个分子内的交联,这种交联降低了某些 tRNA 的生物活性。钝化 tRNA 所需要的辐射注量类似于抑制细菌生长所需要的注量,因此,似乎可以断定,近紫外辐射在大肠杆菌中所引起的生长延迟是由于含 4-硫尿嘧啶的 tRNA 分子的光化学变化造成的<sup>[34]</sup>。

在其它生物中,人们已观察到光引起生长延迟的其它机制,例如,蓝光引起细胞中细胞色素  $a_3$  的钝化(参阅 15.7.3)。

### 15.7.2.2 致死和致突变效应

近紫外辐射的致死和致突变效应已经有人作了综述<sup>[29,33]</sup>,在 15.7.1 中讨论了由近紫外辐射所引起的细胞钝化的两种分子机制,近紫外辐射在细菌的 DNA 中可产生胸腺嘧啶二聚体,还能够产生 DNA 链的断裂和碱性不稳定键<sup>[35]</sup>。近紫外照射溶液中的色氨酸产生致死和致突变剂——过氧化氢<sup>[36]</sup>,这可能是通过光在色氨酸上打出的电子的作用造成的。

## 15.7.3 可见光

这本书的许多章节是谈可见光的有益效应的(例如:视觉、光形态建成、光合作用),但是可见光也可能产生有害的作用,它对细菌是致突的,并需要氧的存在,因此可见光的致突作用可能是通过光动力作用的机制造成的<sup>[37]</sup>。可见光也可引起致死(图 15-2)。特别是对那些修复系统有缺陷的细菌,在这方面不同波长可见光的协同作用是很重要的(参阅 15.8.1)。

远红光(750nm)在猪肾细胞中可以引起染色体畸变<sup>[38]</sup>和 DNA 合成的抑制<sup>[39]</sup>,绿-黄光(546—579nm)能抑制液体培养的银杏(*Ginkgo*)花粉细胞和单层培养的 Hela 细胞的生长,

但用红光(640—675nm)照射能消除这个效应<sup>[40]</sup>。蓝光能可逆地抑制百合(*Lilium*)和延龄草(*Trillium*)小孢子母细胞中的细胞分裂,这可能是由于光化学上改变了呼吸作用所必需的细胞色素 $a_3$ 所致<sup>[41]</sup>。蓝光亦可在羊毛中产生自由基<sup>[42]</sup>。关于可见光的其它效应最近亦有评述<sup>[43]</sup>。

上述几个效应都是在不加光敏化剂的情况下有的,在有外加敏化剂的情况下可见光的效应是第4章的课题。

### 15.7.4 结论

太阳光中光化学活性高的部分(远紫外、近紫外和可见光)产生对生物系统有利和有害两方面的影响,生物必须设法利用太阳光谱中对它们的生存是不可缺少的那些部分而保护自己不受有害波段辐射的伤害,不同的生物有不同的可用波长和有害波长,生物防止有害辐射伤害的办法是通过迴避反应和屏蔽(例如皮毛、外壳、色素)来防止过度的照射和发展有效的修复系统(参阅5.4)。

大多数发表的关于紫外辐射对细胞影响的研究工作都是用廉价和近乎单色的发光在254nm的杀菌灯进行的,但是,除了在实验情况下,大多数生物系统绝不会遇到这样的辐射,因为太阳光里含有相当大量的近紫外辐射,而大多数生物系统则沐浴在阳光之下,因此关心近紫外辐射的生物效应是可以理解的,而且由近紫外辐射所产生的许多光化学变化不同于254nm辐射所产生的光化学变化。我们需要了解在外加的光敏化剂(例如环境污染物)存在与不存在时近紫外辐射对动植物的影响。我们需要更多有关近紫外辐射与其它波长辐射协同作用的资料(参阅15.8)。总之,我们需要更多地了解我们所生活的环境。

人们把大量的注意力集中于远紫外辐射的有害效应,而



除了维生素D的合成外,在阐明它的可能的有益效应方面却没有花多大力气。而对可见光,情况正好相反,即大量的注意力集中于可见光的有益效应方面,相对来说,在研究没有外加光敏化剂的情况下可见光的有害效应上没有做出多大的努力。

了解各种类型的生物对阳光中不同波长辐射的固有敏感性是很重要的,只有掌握了这些资料,我们才有希望就停止人类可能影响太阳光的质和量的某些活动作出正确的决定。当前人们关心的一个问题是超音速飞机排出的废气、药物喷雾器放出的氯氟碳化物和制冷系统的泄漏气体对大气中臭氧层的可能的扰动。

臭氧层的减少会影响到达地球的290—320nm范围内的辐射量,而对较长波段的影响几乎是微乎其微的。另一方面,气溶胶(灰尘)和小水珠(云)能大大减弱紫外和可见辐射<sup>[41]</sup>。目前迫切需要知道的是关于阳光中(290—320nm)辐射量的增加对关键物种例如浮游生物和对主要粮食作物影响的资料。

## 15.8 不同波长辐射的非相加效应 (协同作用和对抗作用)

当生物系统受到两种不同波长的光照射时,所观察到的效应往往并不是每个波长光单独作用的相加,人们最常观察到的是协同作用(即两种波长同时照射的效应大于它们单独照射时效应的相加)。有时这两个效应是抵消的(即协同作用的反面),有时它们全然没有任何相互作用。然而当我们采用多色辐射源时,不管这光源是人造光源还是自然光源,脑子里应该想到有协同作用或对抗作用的可能。

### 15.8.1 协同作用

重组能力有缺陷的细菌也在 DNA 修复的几种过程上有缺陷,它们很容易被近紫外辐射和普通的白荧光灯杀死。然而,当致死的作用光谱作用于有重组缺陷的细菌时,这些细菌对近紫外辐射的任何一个波长均不表现出特别的敏感性,这个结果说明这些突变的细菌对于宽谱的近紫外辐射的特别敏感性是由于不同波长近紫外辐射的协同效应所致<sup>[45]</sup>。

近紫外辐射中两个密切相关的波长之间的协同作用的例子是转化 DNA 的钝化,虽然 334nm 的辐射只引起一点或根本不引起任何转化 DNA 的钝化,但它与 365nm 一起则对钝化产生明显的协同效应<sup>[46]</sup>。虽然我们不知道这种协同作用的分子基础,但它可能是由于与 DNA 结合的发色团所致。

在紫外线(254nm)和电离辐射协同作用方面发表了大量文章,最近有人证明,这种协同作用的一个原因是紫外线对负责修复由 X 射线引起的 DNA 单链断裂的一个特殊酶系的选择性抑制作用<sup>[47]</sup>。

人们还证明近紫外辐射(365nm)通过干扰 DNA 的修复与电离辐射起协同作用<sup>[48]</sup>。

已有人报道远红辐射与 X 射线协同作用在蚕豆中产生染色体畸变。然而,现在已弄清楚这是一个由远红光引起的分裂延迟所造成的假象,远红辐射不会改变染色体畸变的数目,它只不过延长了细胞到达能对染色体畸变进行观察计数的有丝分裂中期的时间<sup>[49]</sup>。

人类皮肤受紫外线 B(290—320nm)照射而产生的红斑和组织学变化可以由于同时受到本身并不引起皮肤任何变化的紫外线 A(320—400nm)的照射而增强<sup>[50]</sup>。

热(过热)和电离辐射之间的协同作用受到那些研究电离辐射对哺乳动物细胞的效应的人们的极大注意(这个问题的

综述请参阅参考文献 51)。在 X 射线照射之前或之后把哺乳动物细胞加热到 40—43℃，这些细胞就更容易被电离辐射杀死，目前人们对把这种协同作用应用于肿瘤治疗抱有极大的希望，人们正在发展某些利用超声和微波的技术来局部加热肿瘤。

有趣的是，在观察到热与 X 射线协同作用的条件下却看不到热与 254nm 辐射的任何协同作用<sup>[51]</sup>。这与最近对细菌的研究结果是一致的，对细菌只观察到了热 (52℃) 与 254nm 辐射之间很小的协同效应，但是对 334nm、365nm、405nm 辐射却有明显的协同作用<sup>[52]</sup> 其次序是  $334\text{nm} > 365\text{nm} > 405\text{nm}$ 。从比较早就在实验动物中观察到热提高了紫外线 (290—320nm) 诱发的皮肤癌的发生来看，人们对这后一种协同效应是特别感兴趣的(参考文献 53 中给出综述)。

### 15.8.2 对抗作用

不同辐射波长之间对抗作用的最熟知的例子可能就是红光和远红光对一些植物光敏色素所调节的响应的作用，红光促进这种作用，而远红光却抑制这种作用(第 11 章)，因此，远红光是红光生物效应的对抗。

另一个在 5.2.4 中叙述过的例子是这样的，用 280nm 的光照射 DNA 产生胸腺嘧啶二聚体，然后再用 240nm 光照射，则使二聚体裂解为单体。这种情况需要非常高的紫外线剂量，才能在二聚体的形成和裂解之间达到光化学平衡，用 280nm 照射，平衡有利于二聚体的形成，而用 240nm 照射，平衡向形成单体的方向移动。

虽然上述例子是纯粹光化学的，但还有另一种对抗作用，它在性质上更偏重于生物学，当接连用 X 射线和 254nm 或 365nm 两种辐射照射时，它们之间有协同作用(参阅 15.8.1)，

但是,如果这两种照射之间相隔 1 小时或者培养基更换两次,那就可以观察到对抗作用,即细胞对第二种照射的抗性大大增加,先用 365nm 光再用 X 射线照射是这样<sup>[54]</sup>,先用 X 射线然后再用 254nm 光或 X 射线照射也是这样<sup>[55]</sup>。一些 DNA 修复酶的可能的辐射诱导激活问题目前很受人们的重视<sup>[56]</sup>,对辐射诱导的抗辐射性的提高的另一种解释已经有人作了讨论<sup>[57]</sup>。

## 15.9 用光作为选择工具

了解一个生物系统如何发挥功能或确定它的适应能力的界限的一种经典的方法是干扰这个生物系统,例如改变营养或温度等条件,然后观察生物系统的反应。在前面各章中我们已经看到,为了了解生物系统如何发挥功能,光也是一种干扰生物系统的有用工具,但是,在获得了关于生物系统光化学响应的足够知识之后,人们就能够设计一些实验,在实验中用光作为一个工具来研究特定的生物学或生物化学问题。

例 1 几年前,在作者的实验室里发现,用紫外线照射细胞引起了蛋白质和核酸的交联,这些研究关系到更好地了解紫外辐射的致死效应。最近,靠得很近的核酸和蛋白质能由紫外辐射引起共价交联的概念已被用于研究酶-底物复合物中蛋白质与核酸之间紧密结合的部位。于是人们会问,氨酰 tRNA 合成酶“位于”tRNA 分子的什么部位呢? Schimmel 和他的同事用一系列出色的实验回答了这个问题<sup>[57]</sup>。

对于每一种氨基酸至少有一个特定的合成酶和 tRNA,为了防止合成出改变了的蛋白质,这两个酶必须无误地把每个氨基酸连到它的同种 tRNA 上, tRNA 都是由大约 75—85 个碱基构成的单链多聚核苷酸,并且都折叠成同样的碱性氢键合的三叶草结构。关键的问题是合成酶-tRNA 相互作用专一

性的分子基础是什么?回答这个问题的一个途径是测定 tRNA 分子中哪些区域靠近和哪些区域不靠近这个合成酶的表面。用紫外线照射酶-tRNA 复合物可形成 RNA-蛋白质交联,然后用只能在鸟嘌呤残基附近切开 RNA 的 TI 核糖核酸酶处理照射过的和未照射的复合物。从未照射的样品中能分离出 14 种不同的 RNA 碎片,但是紫外线照射后,三种碎片从色谱图上消失,这说明它们在紫外线的作用下与酶发生交联,因此,这三个消失的碎片的性质便告诉我们 tRNA 的什么部位靠近合成酶。

在某些情况下,合成酶会把它的氨基酸接到错误的 tRNA 上,例如酵母缬氨酸 tRNA 合成酶能把缬氨酸连到大肠杆菌异亮氨酸 tRNA 上。问题是这个不同种的酵母酶是以与同种酶类似的部位还是不同的部位与大肠杆菌 tRNA 结合的,用光化学交联技术发现,三个结合点中的两个与同种复合物是相同的,但另一个结合点是不同的。

有人综述了另外一些对特定的核酸-蛋白质复合物的结构关系的光化学研究<sup>[57]</sup>,并且还综述了所有已知的无论是化学的还是辐射引起的 DNA 加成反应,在综述中特别谈到了它们在老年学、致癌及放射生物学领域的重要性<sup>[31]</sup>。

例 2 5-溴尿嘧啶 (BrUra) 是胸腺嘧啶的类似物,由于溴原子的大小与胸腺嘧啶 (又称 5-甲基尿嘧啶) 中的甲基相同,故细胞可以把 BrUra 参入到它们的 DNA 中以代替胸腺嘧啶 (Thy)。BrUra 比 Thy 的光化学反应性高,因此含有这种类似物的细胞比正常细胞要容易得多地被紫外线 (和 X 射线) 杀死。BrUra 还有另一个有用的性质,它的吸收光谱延伸到大约 330nm,而 Thy 的吸收光谱只能达到 310nm。因此,含有 BrUra 的细胞可以被 313nm 光照射钝化,而这种光对正常细胞几乎没有影响。钝化的这种选择性在分子生物学中是一个

很有用的工具,下面举几例加以说明。

Puck 和 Kao<sup>[58]</sup> 把哺乳动物细胞放在缺少一种特定营养但含 5-溴脱氧尿嘧啶核苷的培养基里培养,从而浓集它们之中天然存在的需要这种营养的突变细胞,在这样的条件下,这些突变的细胞将不能生长或是不能把 BrUra 参入它们的 DNA 中,但正常细胞却是可以的。然后用长波长的紫外辐射对这些培养细胞进行照射,以杀死正常细胞,并对存活下来的突变细胞(即不含 BrUra 的细胞)进行营养缺乏试验。

含 BrUra 的 DNA 的选择性光解已被用来确定紫外照射后哺乳动物细胞的 DNA 修复“补丁”的存在。紫外线照射之后,让修复在含有 5-溴脱氧尿嘧啶核苷的培养基里进行,然后用 313nm 光照射这些细胞,如果所研究的细胞能进行切除修复,则“补丁”里将有 BrUra 存在,而 313nm 光的照射将在这些“补丁”的位置造成 DNA 的断裂,这些断裂可以用碱性蔗糖梯度法进行测定。如果细胞不能进行切除修复,则将没有任何 BrUra 参入,因此 313nm 的光照将不产生任何单链断裂<sup>[59]</sup>。关于溴尿嘧啶的光化学、光生物学及在分子生物学中的应用已有综述<sup>[60]</sup>。

例 3 细胞受照射后对某个合适染料的选择性荧光最近已被用于建立几种非常有用的技术。

细胞分类器。在细胞生物学中,一个难题是要从给定的组织中获得纯的细胞群体(例如 T 和 B 淋巴细胞)。往往不同类型的细胞在其表面上吸收不同数量的染料(例如荧光素),因此给出不同强弱的荧光,现在已设计出一种装置,它可根据细胞的荧光特性对细胞进行分类,于是它能以每秒高达 5000 个细胞的速率分离类型极相近的动物细胞<sup>[61,62]</sup>。使具有适当荧光的细胞液滴带上负电、正电或不带电,凡带电的液滴在电场中发生偏转,因此落入不同的收集瓶中。这项新技术为细

胞学的研究提供了更多的希望。

细胞荧光计。在细胞生物学中另一个问题是测定在一个纯的细胞群中处于不同生长周期的细胞数目。如果人们采用能与 DNA 选择性结合的荧光染料(例如菲啶溴红),则细胞的荧光将正比于它们的 DNA 含量。现在已经有了能在一条细胞液流中测定每个细胞的荧光特性的细胞荧光计,然后,按含不同数量 DNA 的细胞的数目分布给出数据<sup>[62]</sup>。G<sub>1</sub> 期的细胞有一个 DNA 补体, G<sub>2</sub> 期的细胞有两个 DNA 补体, S 期(即 DNA 合成期)的细胞所含的 DNA 补体数目界于前两者之间。这个技术已被证明在研究药物和辐射对培养细胞的效应方面很有价值。

细胞分类器和细胞荧光计均采用激光来激发荧光。最近有人综述了激光的其它生物学、光化学和光谱学的应用<sup>[63]</sup>。

(张 茵译 沈 恂校)

# 索引

## A

- 阿斯乔夫(Aschoff)规律 270,282,287
- Aufbau 原理 45
- 氨基酸
  - 光动力作用 115
  - 光化学 150
  - 与嘧啶的光化学加成 146,147

- 暗逆转(光敏色素) 350
- 暗破坏(光敏色素) 350
- 暗视觉 293
- 按月亮定向(海滨跳蚤) 394

## B

- Bouguer-Lambert 定律 38
- 靶理论 29
- 白斑病
  - 照片 247
  - 治疗 244,245
- 白炽灯 4
- 胞质环流 390
- 孢子的光产物 145
- 苯并芘(光动力作用致癌) 127
- 比耳(Beer) 定律 38
- 扁虫(*Dendrocoelom lactoum*) (光激运动) 389
- 扁虫(*Planaria gonocephala*) (光激运动) 389
- 表皮(构造) 216
- 丙酮(激发态的结构) 89
- 病毒
  - 不需氧的光敏化 131
  - 光动力作用 117
  - 抗体 118

三线态-三线态敏化 131

突变 118

- 波函数 50
- 波数 50
- 玻恩-奥本海默近似 52
- 不饱和系统的线性加成 80
- 不同波长辐射的非相加效应 497

## C

- Calvin-Benson cycle 循环 436
- 菜豆(近昼夜节律的实验) 273
- 蚕蛾(网膜外光感受) 277
- 草履虫尾状核
  - 对它的光动力效应(实验) 137
  - 光激运动 389
- 草酸铈酐
  - 光化计 131
  - 敏化剂 131
- 常见的关于光的错误概念 480
- 超氧化物
  - 光敏化反应 109
  - 生物发光 468
- 超音速飞行
  - 臭氧层的破坏 183
  - 一氧化氮的产生 183
- 成键轨道 44,45
- 虫萤光素 43
- 虫萤光素酶 453,454
- 抽氢反应 85
- 臭氧
  - 被超音速运输机破坏 183
  - 被氯破坏 184
  - 被一氧化氮破坏 183,184
  - 臭氧的来源 188
  - 氟里昂对它的影响 184



它的破坏引起的生物学后果 185  
吸收光谱 180  
与核酸和蛋白质相似的吸收光谱  
醇类 179  
光动力作用 114  
与嘧啶的光化学加成 146  
猝灭过程 61,108,110,121  
存活曲线  
靶理论 29  
公式 29  
大肠杆菌的光动力致死和紫外线致死  
菌株 B 159  
菌株 K-12 164  
液体支持的修复 157  
照射时的温度效应 147

## D

达尔文与向光性 380  
大肠杆菌  
存活曲线  
光动力作用的存活曲线 121  
紫外线照射的存活曲线  
低温下 148  
室温下 148,158,159,165  
液体保持的修复 158  
基因图 160  
胸腺嘧啶二聚体的最大产额 145  
液体保持的修复 31,157  
直径 27  
致突 168  
紫外吸收 27  
紫外线致死 138,149,164  
ATP 含量 205  
DNA 的修复 157  
大分子的合成 222  
带通滤光片 15  
单纯疱疹(光疗) 248  
单分子光反应 84  
单色仪  
光栅单色仪 19  
棱镜单色仪 18

原理图 19,41  
单线态 48  
单线态-单线态传递 70  
单线态氧  
猝灭剂 121  
反应 100  
敏化剂 115  
胆蛋白 362  
胆红素 250  
蛋白质  
光动力作用 115  
光化学 150  
激发能的传递 72  
酶的光化学钝化 154  
与核酸的交联 147  
aequorin 74

倒钩打开 343  
灯

白炽灯 4  
黑-光灯 11  
黑-光-蓝灯 12,15  
激光 9,67,503  
金属蒸汽弧光灯 9  
近紫外线灯 11,13  
可见光 4  
农用荧光灯 10  
杀菌灯 7  
氙弧灯 8,14  
水银弧光灯 8,9,12,13  
危害性 13  
荧光灯 5  
有色荧光灯 8  
远紫外线灯 13

第 I 类和第 II 类光敏化反应 108  
低养分水 188,192  
电磁辐射谱  
表 36  
图 2  
电循环反应 82,84,91  
电子激发态分子的弛豫  
辐射性弛豫 56  
无辐射弛豫 58

电子能级 54  
电子能量的传递 67  
动物  
    光动力作用 123  
    与疾病有关的光敏性 123  
对称性禁戒跃迁 51  
对称性选择定则 51  
对抗作用(不同波长的辐射) 499  
多鞭膝沟藻  
    近昼夜节律 255  
    生物发光 256  
    生物发光节律相移作用光谱 266  
    时相反应 262  
    吸收光谱 178  
多形态化 365  
钝化截面 30  
DNA 与蛋白质的交联 147,500

## E

Emerson 增益 417  
二苯甲酮 102  
二氧化碳的固定  
    碳 3 循环 436  
    碳 4 循环 437

## F

Franck-Condon 原理 55  
发光光谱学 462  
发光颗粒 464  
发光体 464  
发色团 42  
发射光谱(见光谱)  
反比定律 32,353,374  
反键轨道 45  
反应中心(光合作用) 412  
放射自显影 222  
放氧(光系统 II) 426  
非绝热反应 92  
非均裂的劈开 90  
非预定的 DNA 合成 224  
分光光度计 39  
分子的电子状态 42

分子的轨道 43  
分子的结构和吸收光谱 41  
分子的能级 43,54  
分子的势能图 55  
辐射度(定义) 21  
浮游动物(水生光生物学) 191  
浮游植物  
    产量 202  
    趋光性 188  
    水生光生物学 190  
孵化(棉蛾),启动节律的作用光谱 268  
氟里昂

    臭氧的破坏 182  
    光化学 182  
补骨脂素  
    白癜风的治疗 244  
    光敏化作用 107,128  
    结构 129  
    与核酸的反应 130  
    治疗牛皮癣 246  
复制后修复

## 基因控制

    大肠杆菌 164  
    哺乳类细胞 223  
描述 162  
模型 163

## G

钙在生物发光中的作用 462  
钙在视觉中的作用 332  
干涉滤光片 16  
高凉菜(近昼夜节律) 261,262  
格罗撒斯和德拉珀定律 35  
共振传递机制 152  
骨架重排 82  
光  
    常见的关于光的错误概念 480  
    光捕捉(光合作用) 409  
    光散射 25,28  
    光源(见灯)  
    酶的光激活 489  
    用光作为一种选择工具 500

- 光变态反应 238
- 光的强度(定义) 20
- 光的吸收
  - 电子状态 42
  - 分子结构 41
  - 经验规律 38
- 光电倍增管 23
- 光电管 23
- 光动力作用
  - 氨基酸 115
  - 病毒 117
  - 醇类 114
  - 蛋白质 115
  - 动物 122
  - 核酸 116
  - 嘧啶 116
  - 敏化剂的结构 112,113
  - 嘌呤 116
  - 食物的光变质 127
  - 糖类 114
  - 天然光敏感性 125
  - 细胞水平 120
  - 亚细胞水平 119
  - 植物 122
  - 脂 114
  - 脂肪酸 114
  - 致突 118
- 光害性 236
- 光反应的规则 86
- 光伏打电池 22
- 光复活
  - 光复活造成的致突 143
  - 描述 161
- 光感受(网膜外) 274
- 光合磷酸化
  - 高能中间产物 429
  - 化学渗透假说 429
  - 循环与不循环的光合磷酸化 428
- 光合作用
  - 二氧化碳的固定 436
  - 概述 401
  - 光合磷酸化 428
  - 光合作用的结构组织 434
  - 光合作用里的色素 403,408
  - 光合作用作为一种能源 438
  - 光化学转化 409
  - 光谱学 414
  - 光捕捉 409
  - 进化 400
  - 两个光系统 415
  - 实验 443
  - 水生光生物学 190
  - 未来的研究 442
- 光合作用单元 413
- 光化(太阳的)
  - 皮肤的变性 226
  - 弹性组织变性 226
- 光化计 23,131,174
- 光化学 77
  - 氨基酸 150
  - 常见的总光反应 80
  - 蛋白质 150
  - 核酸 138
  - 结构-反应性关系 88
  - 嘧啶 140
  - 嘌呤 140
  - 视觉的光化学 319
  - 原初光反应 84
- 光化学里结构-反应活性的关系 88
- 光激运动 389
- 光技术 1
- 光疗(见光医学)
- 光密度(定义) 39,181
- 光敏化 105
  - 第I类过程 108
  - 第II类过程 108
  - 概述 98
  - 光动力作用 107
  - 光敏化的应用 133
  - 皮肤 236
  - 胸腺嘧啶二聚体的形成 142
  - 药物引起的光敏化 123
  - 与光敏化有关的疾病 123
  - 与氧无关的机制 128

与氧有关的机制 107  
光敏化剂的结构 112, 113, 129  
光敏色素  
  高辐照度响应系统 354  
  光敏色素的暗逆转 350  
  光敏色素的暗破坏 350  
  光敏色素的反应 349  
  光敏色素的合成 352  
  光形态建成 339  
  光致变色分子 346  
  红光吸收型和远红光吸收型光敏色素 349  
  推测的分子结构 348  
  吸收光谱 347  
  细胞器的运动 390  
  异化基因的激活 357  
  与膜的相互作用 358  
  作用部位 352  
光谱(吸收光谱和发射光谱)  
  白荧光灯 6  
  玻璃滤光片的透射光谱 16  
  不透明物体 482  
  臭氧 180  
  多鞭膝沟藻 178  
  二苯蒽 40  
  汞灯 6, 11, 12  
  光黄素 465  
  光敏色素 346  
  光谱分析 404  
  褐藻 (*Endarachne*) 404  
  黑光灯 12  
  红藻 (*Iridaea*) 433  
  红藻 (*Maripelta*) 404  
  黄绿藻 (*Pleurochloris*) 404  
  黄素单核苷酸 (FMN) 465  
  近紫外荧光灯 12  
  吡啶的吸收光谱 57  
  绿色光合细菌 (*Cholorobium sp.*) 178  
  绿藻 (*Ulva*) 404, 433  
  明视觉 5  
  农用灯 10

强烈溢光灯 5  
人手 483  
杀菌荧光灯 6  
氙灯 11  
生物发光  
  软体珊瑚虫 (*Renilla*) 460  
  细菌 466  
  萤火虫 456, 458  
视黄醛的希夫碱基 311  
11-视黄醛 313  
视觉色素 312  
视紫红质 313  
细胞色素 f 415  
胸腺嘧啶 145  
胸腺嘧啶二聚体 142  
阳光(不同的时间和地点) 5, 178, 180, 196, 367, 368  
质体蓝素 415  
紫色细菌 (*Rhodospirillum sphe.roides*) 178, 404  
作用光谱(见作用光谱)  
  P 430 415  
  P 700 415  
光谱重叠 69  
光谱学 34  
  电磁辐射 35  
  电子能量的传递 67  
  光的本质 35  
  光的吸收 38  
  光声光谱学 485  
  激发分子弛豫的路径和速率 55  
  激发分子的相互作用 62  
  激发分子的探测 65  
  练习 75  
光声光谱学 485  
光生物学的新课题 479  
  不透明物体的吸收谱 482  
  常见的关于光的错误概念 480  
  对抗作用 499  
  环境照明对人的影响 486  
  近紫外线(有害效应) 494  
  可见光(有害效应) 495

酶的光激活 489  
免疫学 487  
协同作用 498  
用光作为一种有选择性的工具 500  
光生物学里的免疫学  
  皮肤癌 488  
  胸腺嘧啶光产物的探测 487  
光生物学实验 26  
光系统 I 和光系统 II 413, 419, 420, 423  
光形态建成 338  
  倒钩伸开 345  
  高辐照度响应系统 354  
  光敏色素系统 341  
  光形态建成的重要性 366  
  茎伸长 345  
  蓝光反应 360  
  类胡萝卜素的合成 360  
  去黄化 345  
  商业上的重要性 369  
  实验 372  
  未来的研究 370  
  叶绿素的合成 345  
  叶片增大 345  
  异化基因的激活 357  
  藻类 338  
光学跃迁 50  
光氧化 83, 100, 108, 109  
光医学  
  白癜风 245  
  单纯性疱疹 248  
  高胆红素血症 249  
  光的全身性效应 249, 250  
  牛皮癣 246  
  皮肤结核 245  
  新生儿黄疸 249  
  紫外线对皮肤的效应  
    有害的效应 217  
    有益的效应 244  
光运动  
  光激运动 380, 379  
  光指向反应 391

趋光性 379, 382  
实验 396  
未来的研究 395  
细胞器的运动 390  
向光性 380  
“发光指挥棒” 450  
光指向反应  
  定义 380  
  海滨跳蚤 394  
  甲壳类 394  
  棕鸟 (starling) 393  
  蜜蜂 392  
光致变色分子  
  光敏色素 346, 349  
  酶的抑制剂 491  
光周期性反应 285, 286, 287  
轨道  
  成键轨道 43  
  反键轨道 43  
  甲醛的轨道 44  
  乙烯的轨道 43  
国际单位制 3, 20  
果蝇  
  近昼夜节律 253  
  羽化的时相反应 262  
  羽化节律相移的作用光谱 266  
过氧化氢(生物荧光) 468

## H

Hill-Bendall 图 417, 418  
海棠属植物 (*Hypericum*) 124  
海萤(生物发光) 458  
海蜇 (*Aequorea*) (生物发光) 74, 460  
核酸  
  对核酸的光动力作用 117  
  光化学 138  
  激发能的传递 73, 144  
  修复 157, 30, 157, 223  
  与蛋白质的交联 147  
  与咪唑香豆素的反应 129  
核糖核酸的光化学 149, 500  
核炸弹

- 破坏臭氧层 183
- 产生一氧化氮 183
- 褐藻 407
- 黑-光灯 11,12
- 黑-光-蓝灯 12,15
- 黑色素生成 223
- 黑脂膜 330
- 红斑(见晒斑)
- 红血球(对它的光动力作用) 120,156
- 红藻 407
- $\beta$ -胡萝卜素(结构) 406
- 花青苷的合成 354,374
- 化学发光反应 449
- 化学滤光片 15
- 还原性加成 80
- 环丁烷型嘧啶二聚体
  - 大肠杆菌里它的最大产额 145
  - 光谱 145
  - 结构 142
  - 细胞冰冻时它的产额减少 148
  - 形成 142,143
- 环加成 81,85,91
- 环境光生物学 175
  - 对动物的影响 486
  - 对人的影响 486
  - 实验 210
  - 水生光生物学 190
  - 太阳紫外线的效应 177
- 换同型碱突变 168
- 换异型碱突变 168
- 黄疸病(新生儿) 249
- 黄化苗 344
- 黄素单核苷酸 (FMN) (细菌的生物发光) 465
- 黄素蛋白(光系统 I) 421
- 黄素型光受体 361
- 回旋运动 (Klinokinesis) 378

## J

- Jablonski 能级图 47,60,76
- 基粒 427,434
- 基态 47

基质 434

## 激发

- 光化学 77
- 光谱学 34
- 激发的传递
  - 核酸的激发传递 73,144
  - 一般情况的激发传递 100
- 激发的迁移(蛋白质) 73,152
- 激发分子
  - 弛豫的路径和速率 55
  - 探测 65
  - 相互作用 62
- 激发分子的探测
  - 发光光谱学 65
  - 闪光光解 66
- 激发分子的相互作用
  - 双分子反应 64
  - 微环境的影响 62
- 激发复合物 63,101
- 激发子 64
- 激光器 9,14,67,503
- 脊椎动物的眼(结构和功能) 294
- 剂量

人射剂量(见注量)

吸收剂量 21

## 剂量学

- 光电器件 22
- 光化计 23,24,131,174
- 化学系统 23,24,131,174
- 莫罗维茨修正 26
- 热电堆 21
- 生物系统 24,25
- 甲醛(分子轨道) 46
- 价态重排 82
- 角膜(紫外线损伤) 13
- 角质层 216
- 结构的重排

电循环重排 82,84

骨架重排 82

价态重排 82

截止滤光片 15

金属蒸气弧光灯 9

锦紫苏(近昼夜节律) 253  
 近昼夜节律 253  
   变种 260  
   菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 273  
   多鞭膝沟藻 (*Gonyaulax polyedra*) 256  
   果蝇 257  
   近昼夜节律的启动 267  
   近昼夜节律的实验 273  
   近昼夜节律的调整 259, 263, 279  
   近昼夜节律的相移 260  
   近昼夜节律的自行存在 279  
   近昼夜钟的膜模型 270  
   控制近昼夜节律的光受体 272  
   例子 255  
   眼虫藻 (*Englena*) 257  
   螺旋调相面 262  
   脉孢菌 (*Neurospora*) 257  
   棉蛾 (*Pectinophora gossypiella*) 260, 268  
   奇异点 262  
   强光使近昼夜节律停止 268, 282  
   人的近昼夜节律 258  
   相移的作用光谱 265  
   檐雀 279  
   运动的近昼夜节律(檐雀) 279  
   自动分相 269  
 近昼夜节律的基因控制 260  
 近昼夜钟  
   光对近昼夜钟的影响 282  
   连续的强光使钟停止 282  
   膜模型 270  
 近紫外线效应  
   生长延迟 294  
   致死 295  
   致突 495  
 茎伸长 345  
 绝热反应 92  
 均裂的键劈开 85, 90

## K

开花过程 341, 365

## 可见光

定义 36  
 关于可见光的错误概念 481  
 光源(见灯)  
 它的有害效应 495  
 组织的透光性 483

库仑作用 68

昆虫(有感知近紫外线能力的) 186

## L

蝌蚪(网膜外的光感受) 278

## 蓝光反应

光感受器的性质 361  
 类胡萝卜素的合成 360  
 作用光谱 361

蓝绿藻 405

## 类胡萝卜素

蓝光反应 360  
 类胡萝卜素的功能 409  
 类胡萝卜素对光动力作用的防护 120  
 类胡萝卜素生物合成的作用光谱 361

实验 374

类囊体 429, 434

联极 23

亮度(定义) 21

## 量子产额

氨基酸破坏的量子产额 151  
 定义 29, 61, 94  
 化学发光的量子产额 452  
 化学反应的量子产额 94  
 磷光的量子产额 61  
 酶钝化的量子产额 29, 155  
 生物发光的量子产额 452  
 胸腺嘧啶破坏的量子产额 143  
 荧光的量子产额 61, 452  
 萤光素的光动力效率 113

## 磷光

定义 56  
 磷光的量子产额 61  
 磷光的衰变 75

## 卤代甲烷

臭氧的破坏 181

卤代甲烷的光分解 184

## 滤光片

玻璃滤光片 15

干涉滤光片 16

化学滤光片 15

截止滤光片 15

滤光片的带宽 16

滤光片的带通 15

中性滤光片 17

## 氯

氯对臭氧层的破坏 182

氯氟甲烷的光分解 184

绿色光合细菌 (*Cholorobium* sp.)(吸收光谱) 178

绿藻 408

螺旋调相面 262

## M

马尔皮基氏细胞 (Malpighian cell) 217

## 脉孢菌

近昼夜节律 257

蓝光反应 360

类胡萝卜素的合成 360

芽孢分生的时相反应 262

作用光谱

类胡萝卜素合成的作用光谱 360

启动节律的作用光谱 267

## 酶

酶的光化学 154

酶的光化学钝化的量子产额 29

酶的光激活 489

## 嘧啶

孢子的光产物 145

光动力作用 116

环丁烷型二聚体 142

水合光产物 140, 159

与氨基酸的加成物 146

与醇的加成物 146

与呋喃香豆素的反应 130

## 蜜蜂

光指向反应 391

环境光生物学 186

## 棉蛾

近昼夜节律 253

启动孵化节律的作用光谱 267

明视觉 5, 294

摩尔消光系数

氨基酸的消光系数 152

定义 30, 39

光敏色素的消光系数 347

## N

内转换 58

能量传递

单线态-单线态能量传递 70

福斯特(Förster)能量传递 69, 411

库仑能量传递 69

理论 67

偶极子-偶极子能量传递 68

碰撞能量传递 70

三线态-三线态能量传递 70

生物系统的能量传递

蛋白质 73

核酸 73

尼尔斯·芬森(Nielis Finzen) 245

逆环加成 85

粘菌 *Dictyostelium* 361

念珠藻 364

牛皮癣

补骨脂素治疗 246, 247

戈埃克曼(Goekerman)治疗法 246

照片 248

治疗 243, 246

## O

偶极子相互作用 68

## P

盘膜 301

泡利(Pauli)不相容原理 43, 46, 48

胚芽鞘

实验 396



向光性 380  
喷气时滞 258  
喷雾器和臭氧层 184  
碰撞激发传递 71  
皮肤  
    病理 220  
    大分子合成和紫外线 222  
    构造 216  
    光学特性 214  
    皮肤癌 227  
    皮肤的光化变性 226  
    日光的急性效应 217  
    日光的慢性效应 226  
    紫外线损伤 13,215,226  
    DNA 修复 223  
皮肤的光敏感性 236  
皮肤里维生素D的形成 244  
片层 434  
嘌呤  
    光动力作用 116  
    光化学 140  
卟啉症  
    牛 124  
    人类 242  
P 430  
    差光谱 415  
    光系统 I 420  
P 700  
    差光谱 415  
    光系统 I 420  
Q  
Q(光系统 2) 424  
奇异点 262  
腔肠动物的生物发光 460  
荞麦属 124  
切除修复  
    非预定的 DNA 合成 224  
    切除修复的基因控制  
        大肠杆菌 163  
        人的细胞 223  
    切除修复的描述 31,161

切除修复的模型 162  
液体保持的修复 31,157  
切赛皮克海湾的水生光生物学 192  
切赛皮克海湾里的光透区 207  
趋光性

    浮游植物 188  
    昆虫 186  
    绿鞭毛虫 385  
    双鞭甲藻 (*Gyrodinium*) 386  
    讨论 382  
取代反应 81  
去黄化 345  
群论 52

## R

热电堆 21,22  
人

    光变态反应性 238  
    光毒性 236  
    光疗 245  
    光敏感性 236  
    近昼夜节律 255  
    皮肤癌 227  
    晒斑 217  
    视觉 292  
人工脂膜(视紫红质) 330  
瑞利散射 186

## S

Stern-Volmer 猝灭 64  
塞克琪圆盘 195  
三磷酸腺苷 (ATP)  
    三磷酸腺苷与光合作用 428  
生物发光 454  
    天然水中三磷酸腺苷的测量 205  
三线态 48  
三线态-三线态传递 70,144,494  
杀菌灯 6,7,13  
晒斑  
    大分子合成 222  
    发病的时间进程 217  
    发病原理 220  
    电子显微镜观察 222

光学显微镜观察 220  
紫外A区和紫外B区的协同作用 217  
作用光谱 96, 178, 218  
DNA 修复 223  
氙弧灯 8, 11  
闪光光解 66  
生色基 42  
生物发光  
多鞭膝沟藻的生物发光(近昼夜节律) 256  
过氧化氢系统 468  
海萤的生物发光 458  
化学发光反应 447  
腔肠动物的生物发光 460  
生物的化学发光 469  
生物发光的起源和功能 472  
生物发光反应的概述 452  
生物发光反应的应用 474  
生物发光相移的作用光谱 266  
实验 477  
细菌的生物发光 464  
萤火虫 454  
生物发光的衰变 475  
生物学实验  
生物钟学(见近昼夜节律)  
实验和练习  
光复活 173  
光合作用 443  
光化学  
概论 103  
核酸的光化学 172  
光敏化 108  
光谱学 75  
光形态建成 372  
光运动 397  
环境光生物学 210  
近昼夜节律 273  
趋光性 396  
生物发光 476  
向光性 396  
紫外存活曲线 173

实验内容 26  
时间尺度  
光化学 80  
光生物学 80  
光物理 80  
食物的光变质 127  
视杆 292  
视杆外段 298  
离子流 329  
视杆外段的二色性 315  
视杆外段结构的模型 307  
形态 298  
视黄醛(见维生素A衍生物)  
视觉 291  
概述 292  
脊椎动物视网膜的构造 296  
光刺激的可测反应 319  
明视觉 293  
明视觉的光谱 5  
视觉的光化学 319  
视觉兴奋和适应的机制 331  
视觉色素 310  
光谱 312, 313  
结构 310  
类似物 318  
视觉兴奋 331  
对酶的需要 333  
钙的作用 332  
内传递介质假说 331  
视觉循环 322  
视网膜  
分子结构 303  
化学研究 303  
脊椎动物的视网膜 296  
结构 294  
视觉 291  
形态观察 297  
紫外线损伤 13  
视网膜电图(ERG) 278, 325  
视锥  
人视网膜上视锥的分布 299  
视锥的类型 313

视紫红质 294  
光化学 319  
位于视杆外段盘膜上 307  
吸收光谱 313, 317

势能图(分子的) 55  
盐生盐杆菌(膜) 303  
噬菌体(见“病毒”)  
双鞭甲藻

分布情况 198  
光合作用 204, 407  
积累机制 197  
趋光性 386  
昼行夜上的迁移 201

双分子光反应 85

水化电子 153

水生光生物学  
河口生态系统 192  
实验 210

水下阳光的谱分布 195

水银弧光灯  
低压水银弧光灯 5  
高压水银弧光灯 8  
中压水银弧光灯 9

“睡眠运动”(菜豆) 273

顺-反异构化 82, 84

丝状蓝绿藻(花丝形成) 362

松果体 278

## T

碳 3 循环 436

碳 4 循环 437

碳 4 植物 435

糖类

光动力作用 114

紫外线的效应 139

天然光敏感性

大肠杆菌 126

颤蚓属腔肠动物 (*Tubifex*) 125

无色藻类(*Prototheca zopfii*) 126

棘虫属原生动物 (*Blepharisma*)  
126

铁氧还蛋白(光系统 I) 421

透射率(定义) 39

脱氧核糖核酸 (DNA) 修复的基因控制 160

## W

网膜外光感受 277

脊椎动物 278

未来的研究 289

无脊椎动物 277

维生素 A 的衍生物

11-顺视黄醛的吸收光谱 304

衍生物的结构 310

维生素 E (防止氧化损伤) 336

温度敏感的突变 172

无辐射弛豫 58

无序生长 363

无意义突变 169

误义突变 169

## X

西格马 ( $\Sigma$ ) 型键重排 84

希夫碱基 (Schiff bases) 309

吸收带宽 53

吸收截面 30

吸收率(定义) 39

细胞

对细胞的光动力作用 120

分类 502

荧光标记 487, 502

细胞器的运动 390

细胞色素 550 ( $c_{550}$ ) (光系统 II) 424

细胞色素  $b_{559}$  (光系统 II) 427

细胞色素  $b_{563}$  (光系统 I) 423

细胞色素 f

差光谱 415

光系统 I 422

细胞荧光计 503

系统间渡越 58

线色散倒数 18

相移(近昼夜节律) 260

引起生物发光相移的作用光谱 261

引起羽化相移的作用光谱 262

香豆素 102

- 小球藻 (*chlorella*) (光合作用) 411
  - 效率光谱(晒斑) 98
  - 协同的反应 78
  - 协同作用
    - 不同波长的辐射 498
    - 晒斑(紫外A区与紫外B区) 217
  - 形态学
    - 脊椎动物的视网膜 297
    - 皮肤 215
  - 胸腺嘧啶二聚体
    - 大肠杆菌中的最大产额 145
    - 二聚体的裂解 131
    - 光离解 101
    - 光谱 131
    - 结构 81,85,142
    - 敏化二聚体的形成 131,142
    - 皮肤里胸腺嘧啶二聚体的产生 223
    - 异构体 142
  - 修复系统的缺陷
    - 细菌细胞
      - 光动力钝化 120
      - 基因位置图 160
    - 紫外线致死138,148,158,159,165
  - 5-溴尿嘧啶(用作生物学的一种工具) 501
  - 须霉菌 *Phycomyces*
    - 光形态建成 361
    - 向光性 361,380
  - 选则定则
    - 对称性选择定则 51
    - 一级选择定则 52
    - 自旋选择定则 51
  - 血叶啉
    - 红血球的光致溶血 121
    - 人的光敏 123
    - 肿瘤的光疗 127
  - 荨麻症(阳光引起) 239
  - X射线 153
  - X射线衍射(视网膜) 303,308
- Y
- 芽孢分生(脉孢菌群体)
    - 芽孢分生的近昼夜节律 257
    - 芽孢分生的时相反应 262
    - 引起节律的作用光谱 268
  - 亚细胞水平(光动力作用) 119
  - 延迟发光(光合作用) 410
  - 檐雀(网膜外光感受) 279
  - 檐雀的生殖系统(光的影响) 287
  - 檐雀睾丸的重量(年循环) 286
  - 眼(视觉) 292
  - 眼虫藻 (*Englena*)
    - 近昼夜节律 257
    - 趋光性 385
    - 实验 396
  - 燕麦
    - 实验 396
    - 向光性 380
  - 檐雀属(网膜外光感受) 279
  - 阳光
    - 臭氧层的滤光作用180
    - 达到地球的最短波长 367
    - 太阳紫外线增加的生物学后果 185
    - 胸腺嘧啶二聚体的产生 223
  - 阳光的光谱 5,178,180,196,367,368
  - 造成进化的光谱强度 177
  - 养分丰富的水 179,187,192,200
  - 液体保持的修复(大肠杆菌) 31,158
  - 叶绿素
    - 切赛皮克海湾里叶绿素的分布198
    - 切赛皮克海湾里叶绿素的荧光198
    - 体内叶绿素的状态 403
    - 天然水中叶绿素的测量 203
    - 天线叶绿素 413
    - 叶绿素的合成(光控) 345
    - 叶绿素的结构 406
  - 叶绿体
    - 光合作用 434
    - 光运动 391
  - 叶片增大 345,366
  - 一级选择定则 52
  - 一氧化氮
    - 由超音速运输机产生的一氧化氮

183

由核爆炸产生的一氧化氮 183

土壤中细菌产生的一氧化氮 182

由宇宙线产生的一氧化氮 184

与臭氧的反应 182

伊乐藻属 (*Elodea*) (叶绿体的运动)

390

乙烯

分子轨道 43

激发态的结构 89

校正基因的突变 171

异构化(顺-反) 82, 84

荧光

氨基酸的荧光 73

定义 56

细胞的荧光标记 487, 502

荧光的量子产额 61

荧光灯 5

吲哚乙酸(植物生长素) 380, 396

有色荧光灯 9

羽化

蚕蛾(网膜外光感受) 277

果蝇

拂晓前 257

三维调相面 264

时相反应 262

相移的作用光谱 265

原初光反应

单分子反应、协同反应 84

双分子反应 85

原初光反应的规则 86

跃迁矩 50

月光的强度 281

## Z

早期感受器电位 326

藻胆蛋白 362

藻红素(结构) 406

藻类

多形态化 365

光合作用

褐藻、红藻 407

蓝绿藻 405

绿藻 408

光形态建成 362

光诱导形成藻丝体的作用光谱

364

趋光性(眼虫藻) 385, 397

水生光生物学 190

形成藻丝体的光逆变作用光谱

364

藻丝化 362

增益(光合作用) 417

窄化灯的输出光谱 14

单色光源 14

单色仪 18

滤光片 15

着色性干皮症

致癌倾向 227

DNA 修复能力的缺陷 223

真皮层 215

振动耦合 53

振动能级 53

振子强度 50, 54

脂(对脂的光动力作用) 114

脂肪酸(光动力作用) 114

直向运动 378

植物

对植物的光动力作用 122

光合作用(色素) 407

植物的光透性 484

C3 植物 437

植物生长素 380, 396

滞育(Diapause) 277

致癌

臭氧层和皮肤癌 185

光敏化剂和致癌 126, 130

皮肤 227

阳光引起的癌变 185

遗传素质 231

着色性干皮症 231, 235

致突和致癌 172

- 紫外线诱导的癌变 232
- 致突
- 光动力作用、光复活和致突 143
  - 换同致突 168
  - 换异致突 168
  - 温度敏感的突变种 172
  - 无意义突变 169
  - 误义突变 169
  - 研究的方法 170
  - 移码突变种 169
  - 影响大肠杆菌修复的突变 160
  - 有条件的致死性突变种 172
  - 致癌的基础 169
  - 致突的基因控制 169
- 质体醌(光系统 II) 425
- 质体蓝素
- 差光谱 415
  - 光系统 I 422
- 中性滤光片 17
- 中央凹(fovea) 299
- 种子萌发
- 促进萌发的作用光谱 345
  - 光形态建成 339
  - 萌发实验 373
  - 抑制萌发的作用光谱 345
- 注量(定义) 20
- 注量率(定义) 20
- 转动能 53
- 紫色光合细菌(*Rhodospirillum rubrum*) (吸收光谱) 178
- 紫外 A 区(320—400nm) 214
- 紫外 B 区(290—320nm) 216
- 紫外 C 区(< 290nm) 218
- 紫外线的效应
- 氨基酸 150
  - 蛋白质 153
  - 核酸 146
  - 环境 176
  - 角膜 13
  - 嘧啶、嘌呤 140
  - 实验 172
  - 脱氧核糖 139
- 维生素 D 的合成 244
- 紫外线引起皮肤损伤的病理学 220
- 自旋-轨道耦合 52
- 自旋禁戒跃迁 51
- 自旋选择定则 51
- 自由基反应 85, 86, 90, 91, 108, 153, 159
- 总光反应
- 光氧化 83
  - 还原性加成 80
  - 结构重排
  - 电循环重排 82
  - 骨架重排 82
  - 价态重排 82
  - 裂解 83
  - 取代反应 81
  - 异构化(顺-反) 82, 84, 90
  - 与不饱和系统的环加成 81
  - 与不饱和系统的线性加成 80
- 作用光谱
- 大肠杆菌致死的~
  - 定义 32, 96
  - 类胡萝卜素生物合成的~ 360
  - 皮肤变性的~ 220
  - 晒斑(红斑)的~ 98, 178, 218
  - 生物发光节律相移的~ 265
  - 视觉的~ 323
  - 网膜外光感受的~ 278
  - 微球菌 (*M. radiodurans*) 致死  
的~ 149
  - 效率光谱 98
  - 抑制下胚轴生长的~ 356
  - 引起节律活动的~ 268
  - 引起卵孵化的~ 268
  - 羽化节律相移的~ 266
  - 藻类形成藻丝体的~ 364
  - 种子萌发的~ 345, 346
  - 作用光谱测定中的问题 32, 96
  - Z 图 418, 417
- (沈 炯译)

## 参 考 文 献

### 第 1 章

1. J. Jagger, *Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1967). [This is the primary reference for the present chapter, which is drawn largely from Chapter 2. The Appendixes contain useful material.]
2. L. R. Koller, *Ultraviolet Radiation*, Wiley, New York (1965). [An excellent, elementary, highly readable book on techniques. The tabular and graphical data are most useful.]
3. H. H. Seliger and W. D. McElroy, *Light: Physical and Biological Action*, Academic Press, New York (1965). [This was the first textbook on photobiology. The discussion of equipment and physical techniques (seven appendixes) are rather advanced.]
4. J. G. Calvert and J. N. Pitts, *Photochemistry*, Wiley, New York (1966). [Chapter 7 is an extensive discussion of sources, filters, monochromators, measurement techniques, and experimental setups. Highly recommended.]
5. M. W. Berns, *Biological Microirradiation*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1974).
6. Guide to Scientific Instruments, *Science* **194** (1976) [Complete, up-to-date listing of suppliers of specific items. Published every November.]
7. D. A. LeBuis, J. R. Lorenz, W. J. Eisler, Jr., and R. B. Webb, High-intensity vapor lamp for biological research, *Appl. Microbiol.* **23**, 972-975 (1972).
8. W. G. Herkstroeter, A series of sharp-cut and band-pass glass filters for the range 252-800 nanometers, *Mol. Photochem.* **4**, 551-557 (1972).
9. M. Kasha, Transmission filters for the ultraviolet, *J. Opt. Soc. Am.* **38**, 929-934 (1948).
10. H. E. Johns and A. M. Rauth, Theory and design of high intensity monochromators for photobiology and photochemistry: Comparison of spectral purity and intensity of different monochromators, *Photochem. Photobiol.* **4**, 673-707 (1965).
11. C. S. Rupert, Dosimetric concepts in photobiology, *Photochem. Photobiol.* **20**, 203-212 (1974).
12. J. Jagger, A small and inexpensive ultraviolet dose-rate meter useful in biological experiments, *Radiat. Res.* **14**, 394-403 (1961).
13. H. J. Morowitz, Absorption effects in volume irradiation of microorganisms, *Science* **111**, 229-230 (1950).
14. J. Jagger, T. Fossum, and S. McCaul, Volume irradiation of microorganisms: errors involved in the estimation of average fluence per cell, *Photochem. Photobiol.* **21**, 379-382 (1975).
15. R. K. Clayton, *Light and Living Matter*. Vol. 1: *The Physical Part*, McGraw-Hill, New York (1970); Vol. 2: *The Biological Part* (1971).
16. C. S. French and V. M. K. Young, The absorption, action, and fluorescence spectra of photosynthetic pigments in living cells and in solutions, in: *Radiation Biology* (A. Hollaender, ed.), Vol. 3, Chap. 6, McGraw-Hill, New York (1956).
17. F. L. Gates, A study of the bactericidal action of ultraviolet light. III. The absorption of ultraviolet light by bacteria, *J. Gen. Physiol.* **14**, 31-42 (1930).

### 第 2 章

1. H. H. Jaffé and Milton Orchin, *Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy*, Wiley, New York (1962).
2. J. N. Murrell, *The Theory of the Electronic Spectra of Organic Molecules*, Wiley, New York (1963).

- W. West (ed.), Chemical applications of spectroscopy, in: *Technique of Organic Chemistry* (A. Weissberger, ed.), Vol. 9, Wiley-Interscience, New York (1956).
4. A. E. Gillam and E. S. Stern, *Electronic Absorption Spectroscopy*, 2nd ed., Arnold, London (1957).
5. W. G. Herkstroeter, Special methods in absorption spectrophotometry, in: *Creation and Detection of the Excited State* (A. A. Lamola, ed.), Vol. 1, Part A, pp. 1-51, Marcel Dekker, New York (1971).
6. J. D. Roberts, *Notes on Molecular Orbital Calculations*, Benjamin, New York (1962).
7. L. Salem, *The Molecular Orbital Theory of Conjugated Systems*, Benjamin, New York (1966).
8. M. Kasha, Molecular photochemistry, in: *Comparative Effects of Radiation* (M. Burton, J. S. Kirby-Smith, and J. L. Magee, eds.), pp. 72-96, Wiley, New York (1960).
9. M. Kasha, The nature and significance of  $n \rightarrow \pi^*$  transitions, in: *Light and Life* (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), pp. 31-64, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md. (1961).
10. R. B. Leighton, *Principles of Modern Physics*, pp. 233-251, McGraw-Hill, New York (1959).
11. S. P. McGlynn, T. Azumi, and M. Kinoshita, *Molecular Spectroscopy of the Triplet State*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1969).
12. H. Suzuki, *Electronic Absorption Spectra and Geometry of Organic Molecules*, Academic Press, New York (1967).
13. F. Dörr, Polarized Light in Spectroscopy and Photochemistry, in: *Creation and Detection of the Excited State* (A. A. Lamola, ed.), Vol. 1, Part A, pp. 53-122, Marcel Dekker, New York (1971).
14. Th. Förster, *Fluoreszenz Organischen Verbindungen*, Vanderhoeck und Ruprecht, Göttingen (1951).
15. I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd ed., Academic Press, New York (1971).
16. R. S. Becker, *Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence*, Wiley-Interscience, New York (1969).
17. M. Kasha, Paths of molecular excitation, *Radiat. Res. Suppl.* 2, 243-275 (1960).
18. R. M. Hochstrasser, Some principles governing the luminescence of organic molecules, in: *Excited States of Proteins and Nucleic Acids* (R. F. Steiner and I. Weinryb, eds.), pp. 1-30, Plenum Press, New York (1971).
19. J. Tortner, S. A. Rice, and R. M. Hochstrasser, *Adv. Photochem.* 7, 149-173 (1969).
20. N. Mataga and T. Kubota, *Molecular Interactions and Electronic Spectra*, Marcel Dekker, New York (1970).
21. J. W. Longworth, Luminescence spectroscopy, in: *Creation and Detection of the Excited State* (A. A. Lamola, ed.), Vol. 1, Part A, pp. 343-370, Marcel Dekker, New York (1971).
22. W. G. Herkstroeter, Flash photolysis, in: *Physical Methods of Chemistry* (A. Weissberger and B. W. Rossiter, eds.), Part 3B, pp. 521-576, Wiley-Interscience, New York (1972).
23. M. M. Malley, Lasers in spectroscopy and photochemistry, in: *Creation and Detection of the Excited State* (W. Ware, ed.), Vol. 2, pp. 99-148, Marcel Dekker, (1974).
24. A. A. Lamola, Electronic energy transfer in solution: Theory and applications, in: *Technique of Organic Chemistry* (P. A. Leermakers and A. Weissberger, eds.), Vol. 14, pp. 17-126, Wiley-Interscience, New York (1969).
25. R. F. Steiner and I. Weinryb (eds.), *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*, Plenum Press, New York (1971).

### 第 3 章

1. G. Porter, Photochemistry of complex molecules, in: *An Introduction to Photobiology* (C. P. Swanson, ed.), pp. 1-22, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1969).
2. Th. Förster, Adiabatic and non-adiabatic processes in photochemistry. *Pure Appl. Chem.* 24, 443-450 (1970).
3. G. S. Hammond, Reflections on photochemical reactivity, in: *Advances in Photochemistry* (J. N.



- Pitts, Jr., G. S. Hammond, and W. A. Noyes, Jr., eds.), Vol. 7, pp. 373-391, Interscience, New York (1969).
4. N. J. Turro, Photochemical reactions of organic molecules, in: *Energy Transfer and Organic Photochemistry* (P. A. Leermakers, ed.), pp. 133-296, Interscience, New York (1969).
  5. O. L. Chapman, *Organic Photochemistry*, Vol. 1, Marcel Dekker, New York (1967).
  6. D. O. Cowan and R. L. E. Drisko, *Elements of Organic Photochemistry*, Plenum Press, New York (1976).
  7. N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin, San Francisco, Calif. (1977).
  8. J. G. Calvert and J. N. Pitts, Jr., *Photochemistry*, Wiley, New York (1966).
  9. A. Schonberg, *Preparative Organic Photochemistry*, Verlag Chemie, New York (1968).
  10. L. Salem, Theory of photochemical reactions, *Science* **191**, 822-830 (1976).
  11. R. B. Setlow and E. C. Pollard, *Molecular Biophysics*, Addison-Wesley, Reading, Mass. (1962). [The theory and practice of action spectra are discussed on pp. 277-288.]
  12. H. E. Johns, Quantum yields and kinetics of photochemical reactions in solution, in: *Creation and Detection of the Excited State* (A. A. Lamola, ed.), Vol. IA, pp. 123-172, Marcel Dekker, New York (1971). [An especially detailed and lucid description of the experimental aspects of quantum yield measurements.]
  13. A. A. Lamola, Fundamental aspects of the spectroscopy and photochemistry of organic compounds; Electronic energy transfer in biologic systems; and Photosensitization, in: *Sunlight and Man* (M. A. Pathak, L. C. Harber, M. Seiji, and A. Kukita, eds.), pp. 17-55, University of Tokyo Press, Tokyo (1974).

## 第 4 章

1. H. F. Blum, *Photodynamic Action and Diseases Caused by Light*, Reinhold, New York (1941). (Reprinted in 1964 with an updated appendix by Hafner Publ., New York).
2. N. T. Clare, Photodynamic action and its pathological effects, in: *Radiation Biology* (A. Hollaender, ed.), pp. 693-723, McGraw-Hill, New York (1956).
3. L. Santamaria and G. Prino, The photodynamic substances and their mechanism of action, in: *Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry* (U. Gallo and L. Santamaria, eds.), Vol. 1, pp. 260-336, Società Editoriale Farmaceutica, Milan (1964).
4. J. D. Spikes, Photodynamic action, *Photophysiology* **3**, 33-64 (1968).
5. K. C. Smith and P. C. Hanawalt, *Molecular Photobiology* (Inactivation and Recovery), Chapter 9, Photodynamic action, pp. 179-191, Academic Press, New York (1969).
6. J. D. Spikes and R. Livingston, The molecular biology of photodynamic action: Sensitized photoautoxidations in biological systems, *Adv. Radiat. Biol.* **3**, 29-121 (1969).
7. U. Gallo and L. Santamaria (eds.), *Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry*, Vol. III, Parts 1 and 2, North-Holland, Amsterdam (1972). [This volume reports the proceedings of a NATO-sponsored conference on photosensitization phenomena.]
8. J. D. Spikes, Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **244**, 496-508 (1975).
9. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, in: *Free Radicals in Biology* (W. A. Pryor, ed.), Vol. II, pp. 85-133, Academic Press, New York (1976).
10. J. Bourdon and B. Schnuriger, Photosensitization of organic solids, in: *Physics and Chemistry of the Organic Solid State* (D. Fox, M. M. Labes and A. Weissberger, eds.) Vol. 3, pp. 59-131, Interscience, New York (1967).
11. C. S. Foote, Mechanisms of photosensitized oxidation, *Science* **162**, 963-970 (1968).
12. L. I. Grossweiner, Molecular mechanisms in photodynamic action, *Photochem. Photobiol.* **10**, 183-191 (1969).
13. T. Wilson and J. W. Hastings, Chemical and biological aspects of singlet excited molecular oxygen, *Photophysiology* **5**, 50-95 (1970).
14. I. R. Politzer, G. W. Griffin, and J. L. Laseter, Singlet oxygen and biological systems, *Chem.*

*Biol. Interact.* 3, 73-93 (1971).

15. J. D. Spikes and F. Rizzuto, Photodynamic oxidation not involving singlet oxygen, in: *Progress in Photobiology. Proceedings of the Sixth International Congress on Photobiology*, Bochum, Germany, 1972 (G. O. Schenck, ed.), 009, Deutsche Gesellschaft für Lichtforschung e.v., Frankfurt (1974).
16. R. Nilsson and D. R. Kearns, A remarkable deuterium effect on the rate of photosensitized oxidation of alcohol dehydrogenase and trypsin, *Photochem. Photobiol.* 17, 65-68 (1973).
17. H. J. Conn, *Biological Stains*, 7th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Md. (1961).
18. J. D. Spikes and M. L. MacKnight, The dye-sensitized photooxidation of biological macromolecules, in: *Photochemistry of Macromolecules* (R. F. Reinisch, ed.), pp. 67-83, Plenum Press, New York (1970).
19. K. Davies, G. A. Gee, J. McKellar, and G. O. Phillips, Primary photochemical processes of two phototendering dyes on cellulose substrates, *Chem. Ind.* 1973, 431-432.
20. F. H. Doleiden, S. R. Fahrenholtz, A. A. Lamola, and A. M. Trozzolo, Reactivity of cholesterol and some fatty acids toward singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.* 20, 519-521 (1974).
21. J. D. Spikes and M. L. MacKnight, Dye-sensitized photooxidation of proteins, *Ann. NY Acad. Sci.* 171, 149-162 (1970).
22. G. Jori, Photosensitized reactions of amino acids and proteins (yearly review), *Photochem. Photobiol.* 21, 463-467 (1975).
23. E. -R. Lochmann and A. Micheler, Binding of organic dyes to nucleic acids and the photodynamic effect, in: *Physico-chemical Properties of Nucleic Acids*, (J. Duchesne, ed.), Vol. I, pp. 223-267, Academic Press, London (1973).
24. A. Kornhauser, N. I. Krinsky, P. -K. C. Huang, and D. C. Clagett, A comparison of photodynamic oxidation and radiofrequency-discharge generated  $^1\text{O}_2$  oxidation of guanosine, *Photochem. Photobiol.* 18, 63-69 (1973).
25. K. Uehara and T. Hayakawa, Photooxidation of adenine and its nucleotides in the presence of riboflavin. IV. Photochemical reaction and products of NAD, *J. Biochem.* 71, 401-415 (1972).
26. K. C. Smith, The radiation-induced addition of protein and other molecules to nucleic acids, in: *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids* (S. Y. Wang, ed.), Vol. 2, pp. 187-218, Academic Press, New York (1976).
27. C. Wallis and J. L. Melnick, Photodynamic inactivation of animal viruses: A review, *Photochem. Photobiol.* 4, 159-170.
28. C. W. Hiatt, Methods for photoinactivation of viruses, in *Concepts in Radiation Cell Biology* (G. L. Whitson, ed.), pp. 57-89, Academic Press, New York (1972).
29. A. Jaffe-Brachet, N. Henry and M. Errera, The photodynamic inactivation of  $\lambda$  bacteriophage particles in the presence of methylated proflavine, *Mutat. Res.* 12, 9-14 (1971).
30. W. Harm, Dark repair of acridine dye-sensitized photoeffects in *E. coli* cells and bacteriophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 350-358 (1968).
31. T. D. Felber, E. B. Smith, J. M. Knox, C. Wallis, and J. L. Melnick, Photodynamic inactivation of Herpes simplex, *JAMA* 223, 289-292 (1973).
32. A. C. Allison, I. A. Magnus, and M. R. Young, Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization, *Nature* 209, 874-878 (1966).
33. D. S. Williams and T. F. Slater, Photosensitization of isolated lysosomes, *Biochem. Soc. Trans.* 1, 200-202 (1973).
34. R. T. Garvin, G. R. Julian, and S. J. Rogers, Dye-sensitized photooxidation of the *Escherichia coli* ribosome, *Science* 164, 583-584 (1969).
35. I. L. Cameron, A. L. Burton, and C. W. Hiatt, Photodynamic action of laser light on cells, in: *Concepts in Radiation Cell Biology* (G. L. Whitson, ed.), pp. 245-258, Academic Press, New York (1972).
36. N. I. Krinsky, The protective function of carotenoid pigments, *Photophysiology* 3, 123-195 (1968).
37. N. I. Krinsky, Membrane photochemistry and photobiology, *Photochem. Photobiol.* 20, 532-535 (1974).

38. J. Das, B. Bagchi, and U. Chaudhuri, Liquid holding recovery of photodynamic damage in *E. coli*, *Photochem. Photobiol.* **19**, 317-319 (1974).
39. A. A. Lamola, T. Yamane, and A. M. Trozzolo, Cholesterol hydroperoxide formation in red cell membranes and photohemolysis in erythropoietic protoporphyria, *Science* **179**, 1131-1133 (1973).
40. J. Pooler, Photodynamic alteration of lobster giant axons in calcium-free and calcium-rich media, *J. Membrane Biol.* **12**, 339-348 (1973).
41. F. P. Imray and D. G. MacPhee, Induction of base-pair substitution and frameshift mutations in wild-type and repair-deficient strains of *Salmonella typhimurium* by the photodynamic action of methylene blue, *Mutat. Res.* **27**, 299-306 (1975).
42. L. C. Harber and R. L. Baer, Pathogenic mechanisms of drug-induced photosensitivity, *J. Invest. Dermatol.* **58**, 327-342 (1972).
43. W. J. Runge, Photosensitivity in porphyria, *Photophysiology* **7**, 149-162 (1972).
44. M. M. Mathews-Roth, M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick, L. C. Harber, and E. H. Kass, Beta-carotene as a photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria, *N. Engl. J. Med.* **282**, 1231-1234 (1970).
45. D. P. Bremner, Hepatogenous photosensitization. Induction and study in guinea pigs, *J. Comp. Pathol.* **84**, 555-568 (1974).
46. T. P. Yoho, J. E. Weaver, and L. Butler, Photodynamic action in insects. I. Levels of mortality in dye-fed light-exposed house flies, *Environ. Entomol.* **2**, 1092-1096 (1973).
47. A. C. Giese, Photosensitization by natural pigments, *Photophysiology* **6**, 77-129 (1971).
48. A. Eisenstark, Mutagenic and lethal effects of visible and near-ultraviolet light on bacterial cells, *Adv. Genet.* **16**, 167-198 (1971).
49. B. L. Epel, Inhibition of growth and respiration by visible and near-visible light, *Photophysiology* **8**, 209-229 (1973).
50. H. B. Lamberts, Natural photodynamic sensitivity in *Tubifex*, in: *Progress in Photobiology* (B. Chr. Christensen and B. Buchman, eds.), pp. 431-432, Elsevier, Amsterdam (1961).
51. L. R. Barran, J. Y. Daoust, J. L. Labelle, W. G. Martin, and H. Schneider, Differential effects of visible light on active transport in *E. coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 522-528 (1974).
52. A. U. Khan and M. Kasha, An optical-residue singlet-oxygen theory of photocarcinogenicity, *Ann. NY Acad. Sci.* **171**, 24-33 (1970).
53. S. Graneli, I. Diamond, A. McDonough, C. Wilson, and S. Nielsen, Photochemotherapy of glioma cells by visible light and hematoporphyrin, *Cancer Res.* **35**, 2567-2570 (1975).
54. T. Dougherty, G. Grindey, R. Fiel, K. Weishaupt, and D. Boyle, Photoradiation therapy II: Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light, *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115-121 (1975).
55. A. H. Clements, R. H. Van Den Engh, D. J. Frost, K. Hoogenhout, and J. R. Nooi, Participation of singlet oxygen in photosensitized oxidation of 1,4-dienoic systems and photooxidation of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **50**, 325-330 (1973).
56. A. W. M. Sweetsur and J. C. D. White, Studies on the heat stability of milk protein: II. Effects of exposing milk to light, *J. Dairy Res.* **42**, 57-71 (1975).
57. R. Radtke, Storage behavior of potato chips exposed to light and in dark. I. Analysis of alterations of frying oil caused by light (in German), *Fette Seifen Anstrichmittel* **76**, 540-546 (1974).
58. H. W.-S. Chan, Artificial food colours and the photooxidation of unsaturated fatty acid methyl esters: the role of erythrosine, *Chem. Ind.* **1975** 612-614.
59. Ph. P. Van Hasselt, Photooxidation of unsaturated lipids in *Cucumis* leaf discs during chilling, *Acta Bot. Neer.* **23**, 159-169 (1974).
60. L. Musajo and G. Rodighiero, Mode of photosensitizing action of furocoumarins, *Photophysiology* **7**, 115-147 (1972).
61. J. A. Parrish, Methoxalein-UV-A therapy of psoriasis, *J. Invest. Dermatol.* **67**, 669-671 (1976).
62. R. E. Hakim, A. C. Griffin, and J. M. Knox, Erythema and tumor formation in methoxysalen-treated mice exposed to fluorescent light, *Arch. Dermatol.* **82**, 572-577 (1960).
63. E. Rabinowitch and R. L. Bedford, *Spectroscopy and Photochemistry of Uranyl Compounds*,

Macmillan, New York (1964).

64. I. J. Černohorský and G. M. Blackburn, Photodynamic effects of  $\text{Fe}^{3+}$  upon bases of nucleic acids, in: *Radiation Biophysics, Free Radicals, Proc. First Eur. Biophys. Congr.* (E. Broda, A. Locker, and H. Springer-Lederer, eds.), Vol. 2, pp. 29–31, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Vienna (1971).
65. B. Singer and H. Fraenkel Conrat, Effects of illumination in the presence of iron salts on ribonucleic acid and model compounds, *Biochemistry* **4**, 226–233 (1965).
66. M. L. Meistrich and A. A. Lamola, Triplet-state sensitization of thymine photodimerization in bacteriophage T4, *J. Mol. Biol.* **66**, 83–95 (1972).
67. M. Charlier and C. Hélène, Photosensitized splitting of pyrimidine dimers in DNA by indole derivatives and tryptophan-containing peptides, *Photochem. Photobiol.* **21**, 31–37 (1975).
68. G. Jori, Photosensitized oxidation of biomolecules as a tool for elucidating three-dimensional structure, *Anais Acad. Brasil. Cien.* **45**, 33–44 (1973).
69. G. Jori, M. Folin, G. Gennari, G. Galiazzo, and O. Buso, Photooxidation of lanthanide ion-lysozyme complexes. A new approach to the evaluation of intramolecular distances in proteins. *Photochem. Photobiol.* **19**, 419–433 (1974).
70. M. W. Berns, *Biological Microirradiation: Classical and Laser Sources*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1974).
71. E. Clausen, Simple and fast assay method for riboflavine, *Lab. Pract.* **24**, 161–162 (1975).
72. V. R. White and J. M. Fitzgerald, Dye-sensitized continuous photochemical analysis: Identification and relative importance of key experimental parameters, *Anal. Chem.* **47**, 903–908 (1975).
73. R. Rabson and J. R. Plimmer, Photoalteration of pesticides: Summary of workshop, *Science* **180**, 1204–1205 (1973).
74. K. Eskins, B. L. Bucher and J. H. Sloneker, Sensitized photodegradation of cellulose and cellulosic wastes, *Photochem. Photobiol.* **18**, 195–200 (1973).
75. S. S. Epstein, M. Small, J. Koplan, N. Mantel, and S. H. Hutner, Photodynamic bioassay of benzo[a]pyrene with *Paramecium caudatum*, *J. Natl. Cancer Inst.* **31**, 163–168 (1963).
76. W. S. Hoar, Some effects of radiation on cells. I. Photodynamic action, in: *Experiments in Physiology and Biochemistry* (G. A. Kerkut, ed.), Vol. 1, pp. 132–135, Academic Press, London and New York (1968).

## 第 5 章

1. K. C. Smith and P. C. Hanawalt, *Molecular Photobiology (Inactivation and Recovery)*, Academic Press, New York (1969).
2. J. Jagger, *Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. (1967).
3. A. C. Giese, *Living With Our Sun's Ultraviolet Rays*, Plenum Press, New York (1976).
4. S. Y. Wang (ed.), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Academic Press, New York (1976).
5. A. J. Varghese, Photochemistry of nucleic acids and their constituents, *Photophysiology* **7**, 207–274 (1972).
6. R. O. Rahn, Ultraviolet irradiation of DNA, in: *Concepts in Radiation Cell Biology* (G. L. Whitson, ed.), pp. 1–56, Academic Press, New York (1972).
7. K. C. Smith (ed.), *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology (The Role of Nucleic Acid Addition Reactions)*, Plenum Press, New York (1976).
8. A. D. McLaren and D. Shugar, *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Pergamon Press, Oxford (1964).
9. F. Hutchinson, The lesions produced by ultraviolet light in DNA containing 5-bromouracil, *Q. Rev. Biophys.* **6**, 201–246 (1973).
10. R. O. Rahn, L. C. Landry, and W. L. Carrier, Formation of chain breaks and thymine dimers in DNA upon photosensitization at 313 nm with acetophenone, acetone or benzophenone, *Photochem. Photobiol.* **19**, 75–78 (1974).

11. D. Lenov, J. Salomon, and D. Elad, Ultraviolet- and  $\gamma$ -ray-induced reactions of nucleic acid constituents with alcohols. On the selectivity of the reactions for purines, *Photochem. Photobiol.* **17**, 465-468 (1973).
12. G. R. Banks, D. M. Brown, D. G. Streeter, and L. Grossman, Mutagenic analogues of cytosine: RNA polymerase template and substrate studies, *J. Mol. Biol.* **60**, 425-439 (1971).
13. Yu. A. Vladimirov, D. I. Roschupkin, and E. E. Fesenko, Photochemical reactions of amino acid residues and inactivation of enzymes during UV-irradiation. A review, *Photochem. Photobiol.* **11**, 227-246 (1970).
14. L. I. Grossweiner, Photochemical inactivation of enzymes, *Curr. Top. Radiat. Res.* **11**, 141-199 (1976).
15. A. D. McLaren and O. Hidalgo-Salvatierra, Quantum yields for enzyme inactivation and the amino acid composition of proteins, *Photochem. Photobiol.* **3**, 349-352 (1964).
16. L. Augenstein and P. Riley, The inactivation of enzymes by ultraviolet light. IV. The nature and involvement of cystine disruption, *Photochem. Photobiol.* **3**, 353-367 (1964); see also, *ibid.* **6**, 423-436 (1967).
17. P. C. Hanawalt and R. B. Setlow (eds.), *Molecular Mechanisms For Repair Of DNA*, Plenum Press, New York (1975).
18. R. B. Roberts and E. Aldous, Recovery from ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **57**, 363-375 (1949).
19. K. C. Smith, The roles of genetic recombination and DNA polymerase in the repair of damaged DNA, *Photophysiology* **6**, 209-278 (1971).
20. P. A. Swenson, Physiological responses of *Escherichia coli* to far-ultraviolet radiation, in: *Photochemical and Photobiological Reviews* (K. C. Smith, ed.), Vol. 1, pp. 269-387, Plenum Press, New York (1976).
21. D. E. Lea, *Actions of Radiation on Living Cells*, Cambridge University Press, London (1955) (Reprinted 1962).
22. R. H. Haynes, The influence of repair processes on radiobiological survival curves, in: *Cell Survival After Low Doses of Radiation: Theoretical and Clinical Implications* (T. Alper, ed.), pp. 197-208 Wiley, New York (1975).
23. W. Harm, C. S. Rupert, and H. Harm, The study of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by flash photolysis, *Photophysiology* **6**, 279-324 (1971).
24. E. C. Friedberg, K. H. Cook, J. Duncan, and K. Mortelmans, DNA repair enzymes in mammalian cells, in: *Photochemical and Photobiological Reviews* (K. C. Smith, ed.), Vol. 2, pp. 263-322, Plenum Press, New York (1977).
25. P. Howard-Flanders, DNA repair, *Annu. Rev. Biochem.* **37**, 175-200 (1968).
26. R. B. Setlow and J. K. Setlow, Effects of radiation on polynucleotides, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**, 293-346 (1972).
27. L. Grossman, Enzymes involved in the repair of DNA, *Adv. Radiat. Biol.* **4**, 77-129 (1974).
28. C. D. Town, K. C. Smith, and H. S. Kaplan, Repair of X-ray damage to bacterial DNA, *Curr. Top. Radiat. Res.* **8**, 351-399 (1973).
29. J. E. Cleaver, Repair processes for photochemical damage in mammalian cells, *Adv. Radiat. Biol.* **4**, 1-75 (1974).
30. E. Witkin, Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*, *Bacteriol. Rev.* **40**, 869-907 (1976).
31. B. A. Bridges, Mechanisms of radiation mutagenesis in cellular and subcellular systems, *Annu. Rev. Nuclear Sci.* **19**, 139-177 (1969).
32. C. O. Doudney, Ultraviolet light effects on the bacterial cell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **46**, 116-175 (1968).
33. J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene* (3rd ed.), Benjamin, New York (1976).
34. W. Hayes, *The Genetics of Bacteria and their Viruses* (2nd ed.), Wiley, New York (1968).
35. K. C. Smith, Ultraviolet radiation-induced mutability of *uvrD3* strains of *Escherichia coli* B/r and K-12: A problem in analyzing mutagenesis data, *Photochem. Photobiol.* **24**, 433-437 (1976).
36. J. McCann and B. N. Ames, Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 950-954 (1976).

## 第 6 章

1. Smithsonian Physical Tables (Prepared by W. E. Forsythe), Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. (1959).
2. J. E. Tyler and R. C. Smith, *Measurements of Spectral Irradiance Underwater*, Gordon and Breach, New York (1970).
3. F. T. Haxo, The wavelength dependence of photosynthesis and the role of accessory pigments, in: *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems* (M. B. Allen, ed.), pp. 339-360, Academic Press, New York (1960).
4. A. A. Krasnovsky, The principles of light energy conversion in photosynthesis: Photochemistry of chlorophyll and the state of pigments in organisms, *Prog. Photosyn. Res.* **2**, 709-727 (1969).
5. R. K. Clayton, *Molecular Physics in Photosynthesis*, Blaisdell, New York (1965).
6. H. F. Blum, *Carcinogenesis by Ultraviolet Light*, Princeton University Press, Princeton, N.J. (1959).
7. B. E. Johnson, F. Daniels, Jr., and I. A. Magnus, Response of human skin to ultraviolet light, *Photophysiology* **4**, 139-202 (1968).
8. H. H. Seliger, The origin of bioluminescence, *Photochem. Photobiol.* **21**, 355-361 (1975).
9. R. Buvel and C. Ponnampuruma (eds.), *Chemical Evolution and the Origin of Life*, American Elsevier, New York (1971).
10. A. C. Lasaga, H. D. Holland, and M. J. Dwyer, Primordial oil slick, *Science* **174**, 53-44 (1971).
11. R. J. Cicerone, R. S. Stolarski, and S. Walters, Stratospheric ozone destruction by man-made chlorofluoromethanes, *Science* **185**, 1165-1167 (1974).
12. M. A. Ruderman, Possible consequences of nearby supernova explosions for atmospheric ozone and terrestrial life, *Science* **184**, 1079-1081 (1974).
13. H. C. Urey, Primitive planetary atmospheres and the origin of life, in: *The Origin of Life on Earth* (F. Clark and R. L. M. Synge, eds.), Pergamon, New York pp. 16-22 (1959).
14. M. B. McElroy, S. C. Wolsky, J. E. Penner, and J. C. McConnell, Atmospheric ozone: Possible impact of stratospheric aviation, *J. Atmos. Sci.* **31**, 287-303 (1974).
15. National Academy of Sciences, *Long-term Worldwide Effects of Multiple Nuclear-weapons Detonations*, Washington, D.C. (1975).
16. V. Arena, *Ionizing Radiation and Life*, Mosby, St. Louis, Mo. (1971).
17. National Academy of Sciences, *Biological Impacts of Increased Intensities of Solar Ultraviolet Radiation*, Washington, D.C. (1973).
18. T. H. Goldsmith and G. D. Bernard, The visual system of insects, *Physiol. Insecta*, **2** 165-272 (1974).
19. K. von Frisch, *The Dance Language and Orientation of Bees*, Balknap Press, Cambridge, Mass. (1967).
20. Y. Obara, Studies on the mating behavior of the white cabbage butterfly, *Pieris rapae crucifera Boisduvae*, *Z. Vergl. Physiol.* **69**, 99-116 (1970).
21. R. B. Forward, Jr., Light and diurnal vertical migration: Photobehavior and photophysiology of plankton, in: *Photochemical and Photobiological Reviews*, Vol. 1 (K. C. Smith, ed.), pp. 157-210, Plenum Press, New York (1976).
22. A. C. Giese, *Living with our Sun's Ultraviolet Rays*, Plenum Press, New York (1976).
23. National Academy of Sciences, *Biological Oceanography: Some Critical Issues, Problems and Recommendations*, Washington, D.C. (1975).
24. H. H. Seliger and W. D. McElroy, *Light, Physical and Biological Action*, Academic Press, New York (1965).
25. H. H. Seliger and M. E. Loftus, Growth and dissipation of phytoplankton in Chesapeake Bay. II. A statistical analysis of phytoplankton standing crops in the Rhode and West Rivers and an adjacent section of the Chesapeake Bay, *Ches. Sci.* **15**, 185-204 (1974).
26. R. C. Smith and J. E. Tyler, Transmission of solar radiation into natural waters, in: *Photochemical and Photobiological Reviews*, Vol. 1 (K. C. Smith, ed.), pp. 117-156, Plenum Press, New York (1976).

27. N. G. Jerlov, *Optical Oceanography*, Elsevier, New York (1968).
28. M. E. Loftus, D. V. SubbaRao, and H. H. Seliger, Growth and dissipation of phytoplankton in Chesapeake Bay. I. Response to a large pulse of rainfall, *Ches. Sci.* **13**, 282-299 (1972).
29. M. E. Loftus and H. H. Seliger, Some limitations of the *in vivo* fluorescence technique, *Ches. Sci.* **16**, 79-92 (1975).
30. H. H. Seliger, H. H. Carpenter, M. E. Loftus, and W. D. McElroy, Mechanisms for the accumulation of high concentrations of dinoflagellates in a bioluminescent bay, *Limnol. Oceanogr.* **15**, 234-245 (1970).
31. H. H. Seliger, M. E. Loftus, and D. V. SubbaRao, Dinoflagellate accumulations in Chesapeake Bay, in: *Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms* (V. R. LoCicero, ed.), pp. 181-205, Mass. Sci. and Tech. Found., Wakefield, Mass. (1975).
32. J. D. H. Strickland and T. R. Parsons, *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, Fish. Res. Bd. Canada Bull. No. 167 (1968).
33. W. D. McElroy, H. H. Seliger, and E. H. White, Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin, *Photochem. Photobiol.* **10**, 153-170 (1969).
34. O. Holm-Hanson, Determination of total microbial biomass by measurement of adenosine triphosphate, in: *Estuarine Microbial Ecology* (L. H. Stevenson and R. R. Colwell, eds.), pp. 73-89, University of South Carolina Press, Columbia, S. C. (1973).

## 第 7 章

1. B. E. Johnson, F. Daniels, Jr., and I. A. Magnus, Response of human skin to ultraviolet light, *Photophysiology* **4**, 139-202 (1968).
2. M. A. Pathak and J. H. Epstein, Normal and abnormal reactions of man to light, in: *Dermatology in General Medicine* (T. B. Fitzpatrick, K. A. Arndt, W. H. Clark, A. Z. Eisen, E. J. Van Scott, and J. H. Vaughan, eds.) pp. 977-1036, McGraw-Hill, New York (1971).
3. F. Urbach (ed.), *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation*, Pergamon, New York (1969).
4. T. B. Fitzpatrick, M. A. Pathak, L. C. Harber, M. Seiji, and A. Kukita (eds.), *Sunlight and Man*, University of Tokyo Press, Tokyo (1974).
5. I. Willis, A. Kligman, and J. H. Epstein, Effects of long ultraviolet rays on human skin: Photoprotective or photoaugmentative?, *J. Invest. Dermatol.* **59**, 416-420 (1972).
6. J. H. Epstein, K. Fukuyama, and K. Fye, Effects of ultraviolet radiation on the mitotic cycle and DNA, RNA and protein synthesis in mammalian epidermis *in vivo*, *Photochem. Photobiol.* **12**, 57-65 (1970).
7. J. H. Epstein, Adverse cutaneous reactions to the sun, in: *Yearbook of Dermatology* (F. D. Malkinson and R. W. Pearson, eds.), pp. 5-43, Yearbook Medical Publ., Chicago, Ill. (1971).
8. D. S. Snyder and W. H. Eaglstein, Intradermal antiprostaglandin agents and sunburn, *J. Invest. Dermatol.* **62**, 47-50 (1974).
9. G. F. Wilgram, R. L. Kidd, W. S. Krawczyk, and P. L. Cole, Sunburn effect on keratinosomes, *Arch. Dermatol.* **101**, 505-519 (1970).
10. K. Wier, K. Fukuyama, and W. L. Epstein, Nuclear changes during light-induced depression of ribonucleic acid and protein synthesis in human epidermis, *Lab. Invest.* **25**, 451-456 (1971).
11. K. Fukuyama, W. L. Epstein, and J. H. Epstein, The effect of ultraviolet light on RNA and protein synthesis in differentiated epidermal cells, *Nature* **216**, 1031-1032 (1967).
12. G. A. Soffen and H. F. Blum, Quantitative measurements in changes in mouse skin following a single dose of ultraviolet light, *J. Cell Comp. Physiol.* **58**, 81-96 (1961).
13. W. S. Bullough and E. B. Laurence, Tissue homeostasis in adult mammals, in: *Advances in Biology of Skin*, Vol. 7, *Carcinogenesis* (W. Montagna and R. L. Dobson, eds.), pp. 1-36, Pergamon, Oxford (1966).
14. J. J. Voorhees, E. A. Duell, and W. H. Kelsey, Dibutyl cyclic AMP inhibition of epidermal cell

- division, *Arch. Dermatol.* **105**, 384-386 (1972).
15. J. E. Cleaver, Repair of damaged DNA in human and other eukaryotic cells, in: *Nucleic Acid-Protein Interactions—Nucleic Acid Synthesis in Viral Infection* (D. W. Ribbons, J. F. Woessner, and J. Schultz, eds.), pp. 87-112, North-Holland, Amsterdam (1971).
  16. J. E. Cleaver, Repair processes for photochemical damage in mammalian cells, *Adv. Radiat. Biol.* **4**, 1-75 (1974).
  17. J. E. Cleaver and D. Bootsma, Xeroderma pigmentosum: Biochemical and genetic characteristics, *Annu. Rev. Genet.* **9**, 19-38 (1975).
  18. A. K. Lehman, S. Kirk-Bell, C. F. Arlett, M. C. Paterson, P. H. M. Lohman, E. A. de Weerd-Kastelein, and D. Bootsma, Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 219-223 (1975).
  19. R. L. Olson, J. Nordquist, and M. A. Everett, The role of epidermal lysosomes in melanin pigmentation, *Br. J. Dermatol.* **83**, 189-199 (1970).
  20. J. H. Epstein, K. Fukuyama, and R. L. Dobson, Ultraviolet light carcinogenesis, in: *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation* (F. Urbach, ed.), pp. 551-568, Pergamon, New York (1969).
  21. W. L. Epstein, K. Fukuyama, and J. H. Epstein, Early effects of ultraviolet light on DNA synthesis in human skin *in vivo*, *Arch. Dermatol.* **100**, 84-89 (1969).
  22. H. F. Blum, *Carcinogenesis By Ultraviolet Light*, Princeton University Press, Princeton, N.J. (1959).
  23. J. H. Epstein, Ultraviolet carcinogenesis, *Photophysiology* **5**, 235-273 (1970).
  24. V. M. Maher, L. M. Oullette, R. D. Curren, and J. J. McCormick, Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells, *Nature* **261**, 593-595 (1976).
  25. J. H. Epstein, Photoallergy: A review, *Arch. Dermatol.* **106**, 741-748 (1972).
  26. H. F. DeLuca, Vitamin D: The vitamin and the hormone, *Fed. Proc.* **33**, 2211-2219 (1974).
  27. W. F. Loomis, Skin-pigmentation regulation of vitamin D biosynthesis in man, *Science* **157**, 501-506 (1967).
  28. K. H. Kaidbey and A. M. Kligman, Photopigmentation with trioxsalen, *Arch. Dermatol.* **109**, 674-677 (1974).
  29. J. A. Parrish, T. B. Fitzpatrick, L. Tanenbaum, and M. A. Pathak, Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long-wave ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.* **291**, 1207-1211 (1974).
  30. L. E. Bockstahler, C. D. Lytle, and K. B. Hellman, *A Review of Photodynamic Therapy for Herpes Simplex: Benefits and Potential Risks*, DHEW Publication No. (FDA) 75-8013. (Available from the Bureau of Radiological Health, Rockville, MD 20852.) (1974).
  31. *Phototherapy in the Newborn*, Final report of the Committee, Division of Medical Sciences, National Research Council (2101 Constitution Ave.) Washington D.C., 20418 (1974).

## 第 8 章

1. J. Aschoff (ed.), *Circadian Clocks*, North-Holland, Amsterdam (1965).
2. F. A. Brown, Jr., J. W. Hastings, and J. D. Palmer, *The Biological Clock: Two Views*, Academic Press, New York (1970).
3. E. Bünning, *The Physiological Clock*, 3rd ed., Springer-Verlag, New York (1973).
4. *Proc. Int. Symp. Circadian Rhythmicity*, Wageningen, 1971, Centre for Agricultural Publication and Documentation, Wageningen, The Netherlands (1972).
5. A. Chovnick (ed.), Biological clocks, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25** (1960).
6. M. Menaker (ed.), *Biochronometry*, National Academy of Science, Washington, D.C. (1971).
7. J. D. Palmer, *Biological Clocks in Marine Organisms*, Wiley-Interscience, New York (1974).
8. B. M. Sweeney, *Rhythmic Phenomena in Plants*, Academic Press, London (1969).
9. R. B. Withrow (ed.), *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, Publication No. 55, AAAS, Washington, D.C. (1959).



10. R. Wever, Internal phase angle differences in human circadian rhythms: Reasons for alteration and measurement problems, *Int. J. Chronobiol.* **1**, 371-390 (1973).
11. J. D. Palmer, *An Introduction to Biological Rhythms*, Academic Press New York (1976).
12. V. G. Bruce, Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics* **70**, 537-548 (1972).
13. R. J. Konopka and S. Benzer, Clock mutants of *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2112-2116 (1971).
14. J. F. Feldman and N. M. Waser, New mutations affecting circadian rhythmicity in *Neurospora*, in: *Biochronometry* (M. Menaker, ed.), pp. 652-656, National Academy of Science, Washington, D.C. (1971).
15. J. W. Hastings and B. M. Sweeney, The action spectrum for shifting the phase of the rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*, *J. Gen. Physiol.* **43**, 697-706 (1960).
16. R. Zimmer, Phasenverschiebung und andere Störlichtwirkungen auf die endogenen tagesperiodischen Blütenblattbewegungen von *Kalanchoë blossfeldiana*, *Planta* **58**, 283-300 (1962).
17. C. S. Pittendrigh, Circadian rhythms and the circadian organization of living systems, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 159-184 (1960).
18. M. L. Sargent and W. R. Briggs, The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora*, *Plant Physiol.* **42**, 1504-1510 (1967).
19. R. Halaban, Effects of light quality on the circadian rhythm on leaf movement of a short-day plant, *Plant Physiol.* **44**, 973-977 (1969).
20. A. T. Winfree, Integrated view of resetting of circadian clock, *J. Theor. Biol.* **28**, 327-374 (1970).
21. A. T. Winfree, On the photosensitivity of the circadian time-sense in *Drosophila pseudoobscura*, *J. Theor. Biol.* **35**, 159-189 (1972).
22. W. Englemann, H. G. Karlsson, and A. Johnsson, Phase shifts in the *Kalanchoe* petal rhythm, caused by light pulses of different duration, *Int. J. Chronobiol.* **1**, 147-156 (1973).
23. K. D. Frank and W. F. Zimmerman, Action spectra for phase shifts of a circadian rhythm in *Drosophila*, *Science* **163**, 688-689 (1969).
24. C. S. Pittendrigh, J. H. Eichhorn, D. H. Minis, and V. G. Bruce, Circadian systems. VI. Photoperiodic time measurement in *Pectinophora gossypiella*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 758-764 (1970).
25. M. B. Wilkins, An endogenous rhythm in the rate of CO<sub>2</sub> output of *Bryophyllum*. II. The effects of light and darkness on the phase and period of the rhythm, *J. Exp. Botany* **11**, 269-288 (1960).
26. E. Bünning and I. Moser, Response-Kurve bei der circadian Rhythmik von *Phaseolus*, *Planta* **69**, 101-110 (1966).
27. W. F. Zimmerman and T. H. Goldsmith, Photosensitivity of the circadian rhythm and of visual receptors in carotenoid-depleted *Drosophila*, *Science* **171**, 1167-1169 (1971).
28. B. M. Sweeney, Resetting the biological clock in *Gonyaulax* with ultraviolet light, *Plant Physiol.* **38**, 704-708 (1963).
29. C. F. Ehret, Action spectra and nucleic acid metabolism in circadian rhythms at the cellular level, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 149-158 (1960).
30. V. G. Bruce and D. H. Minis, Circadian clock action spectrum in a photoperiodic moth, *Science* **163**, 583-585 (1969).
31. V. Muñoz and W. L. Butler, Photoreceptor pigment for blue light in *Neurospora crassa*, *Plant Physiol.* **55**, 421-426 (1975).
32. J. Aschoff, Exogenous and endogenous components in circadian rhythms, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 11-28 (1960).
33. J. Aschoff, Response curves in circadian periodicity, in: *Circadian Clocks* (J. Aschoff, ed.), pp. 95-111, North-Holland, Amsterdam (1965).
34. *Biology Data Book*, 2nd ed., Vol. 2, pp. 1016-1039, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md. (1973).
35. F. A. Brown, Jr., The "clocks" timing biological rhythms, *Am. Sci.* **60**, 756-766 (1972).
36. D. Njus, F. M. Sulzman, and J. W. Hastings, Membrane model for the circadian clock, *Nature* **248**, 116-120 (1974).

37. B. M. Sweeney, A physiological model for circadian rhythms derived from the *Acetabularia* rhythm paradoxes, *Int. J. Chronobiol.* **2**, 25-33 (1974).
38. H. D. W. Saddler, The membrane potential of *Acetabularia mediterranea*, *J. Gen. Physiol.* **55**, 802-821 (1970).

## 第 9 章

1. C. M. Williams and P. L. Adkisson, Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm *Antheraea pernyi*, *Biol. Bull.* **127**, 511-525 (1964).
2. J. W. Truman and L. M. Riddiford, Neuroendocrine control of ecdysis in silkmoths, *Science* **167**, 1624-1626 (1970).
3. J. W. Truman, Extraretinal photoreception in insects, *Photochem. Photobiol.* **23**, 215-225 (1976).
4. J. L. Larimer, D. L. Trevino, and E. A. Ashby, A comparison of spectral sensitivities of caudal photoreceptors of epigeal and cavernicolous crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.* **19**, 409-415 (1966).
5. T. L. Page and J. L. Larimer, Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms, *Photochem. Photobiol.* **23**, 245-251 (1976).
6. M. Zweig, S. H. Snyder, and J. Axelrod, Evidence for a nonretinal pathway of light to the pineal gland of newborn rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 515-520 (1966).
7. R. M. Eakin, *The Third Eye*, University of California Press, Berkeley, Calif. (1973).
8. M. Menaker, Nonvisual light reception, *Sci. Am.* **226**, 22-29 (1972).
9. M. Menaker, Extraretinal light perception in the sparrow, I: Entrainment of the biological clock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 414-421 (1968).
10. J. P. McMillan, H. C. Keatts, and M. Menaker, On the role of eyes and brain photoreceptors in the sparrow: Entrainment to light cycles, *J. Comp. Physiol.* **102**, 251-256 (1975).
11. J. P. McMillan, J. A. Elliott, and M. Menaker, On the role of eyes and brain photoreceptors in the sparrow: Aschoff's rule, *J. Comp. Physiol.* **102**, 257-262 (1975).
12. S. Binkley, Constant light: Effects on the circadian locomotion rhythm of the house sparrow, *Physiol. Zool.*, in press (1977).
13. J. P. McMillan, J. A. Elliott, and M. Menaker, On the role of eyes and brain photoreceptors in the sparrow, III: The eyes do not participate in photoperiodic photoreception, *J. Comp. Physiol.* **102**, 263-268 (1975).
14. H. Underwood and M. Menaker, Extraretinal photoreception in lizards, *Photochem. Photobiol.* **23**, 227-243 (1976).
15. M. Menaker and H. C. Keatts, Extraretinal light perception in the sparrow, II: Photoperiodic stimulation of testis growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 146-151 (1968).
16. H. Underwood and M. Menaker, Photoperiodically significant photoreception in sparrows: Is the retina involved? *Science* **167**, 298-301 (1970).
17. M. Menaker, R. Roberts, J. A. Elliott, and H. Underwood, Extraretinal light perception in the sparrow, III: The eyes do not participate in photoperiodic photoreception, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 320-325 (1970).
18. J. P. McMillan, H. Underwood, J. A. Elliott, M. H. Stetson, and M. Menaker, Extraretinal light perception in the sparrow, IV: Further evidence that the eyes do not participate in photoperiodic photoreception, *J. Comp. Physiol.* **97**, 205-213 (1975).
19. M. B. Heaton and M. S. Harth, Non-visual light responsiveness in the pigeon: Developmental and comparative considerations, *J. Exp. Zool.* **188**, 251-264 (1974).

## 第 10 章

1. R. A. Eakin, Structure of invertebrate photoreceptors, *Handbook Sensory Physiol.* **7**(1), 625-684 (1972).
2. T. H. Goldsmith, The natural history of invertebrate visual pigments, *Handbook Sensory Physiol.* **7**(1), 685-719 (1972).

3. M. F. Moody, Photoreceptor organelles in animals, *Biol. Rev.* **39**, 43-86 (1964).
4. M. G. F. Fuortes (ed.), Physiology of photoreceptor organs, *Handbook Sensory Physiol.* **7**(2) (1972).
5. W. A. Hagins, The visual process: Excitatory mechanisms in the primary receptor cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**, 131-158 (1972).
6. A. E. Blaurock and M. H. Wilkins, Structure of frog photoreceptor membranes, *Nature* **223**, 906-909 (1969).
7. R. W. Young, Biogenesis and renewal of visual cell outer segment membranes, *Exp. Eye Res.* **18**, 215-223 (1974).
8. M. J. Hogan, I. S. Wood, and R. H. Steinberg, Phagocytosis by pigment epithelium of human retinal cones, *Nature* **252**, 305-307 (1974).
9. W. Stoeckenius, The purple membrane of *Halobacterium halobium*, in: *The Photosynthetic Bacteria* (R. K. Clayton and W. R. Sistrom, eds.), Plenum Press, New York, in press.
10. R. E. Anderson and L. Sperling, Lipids of ocular tissues. VII. Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments, *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 673-677 (1971).
11. S. Futterman, J. L. Downer, and A. Hendrickson, Effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition, morphology and electroretinographic response of the retina, *Invest. Ophthalmol.* **10**, 151-156 (1971).
12. R. M. Benolken, R. E. Anderson, and T. G. Wheeler, Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation, *Science* **182**, 1253-1254 (1973).
13. S. Schwartz, J. E. Cain, E. A. Dratz, and J. K. Blasie, An analysis of lamellar x-ray diffraction from disordered membrane multilayers with application to data from retinal rod outer segments, *Biophys. J.* **15**, 1201-1233 (1975).
14. R. A. Raubach, P. P. Nemes, and E. A. Dratz, Chemical labelling and freeze-fracture studies on the localization of rhodopsin in the rod outer segment disk membrane, *Exp. Eye Res.* **18**, 1-11 (1974).
15. B. J. Litman and H. G. Smith, The determination of molecular asymmetry in mixed phospholipid vesicles and bovine retinal rod outer segment disk membranes, *Fed. Proc.* **33**, 1575 (1974).
16. G. G. Santillan, and J. K. Blasie, A direct analysis of lamellar X-ray diffraction from lattice disordered retinal receptor disk membrane multilayers at 8A resolution, *Biophys. J.* **15**, 109a (1975); G. G. Santillan and J. K. Blasie, Comparison of the electron density profile for isolated, water-washed photoreceptor disk membranes in intact retina, *Biophys. J.* **16**, 35a, (1976); S. Schwartz and E. A. Dratz, The localization of rhodopsin in the photoreceptor membranes of frog retina, *Biophys. J.* **16**, 36a (1976).
17. B. Honig and M. Karplus, Implication of torsional potential of retinal isomers for visual excitation, *Nature* **229**, 558-560 (1971); B. Honig, A. Warshel, and M. Karplus, Theoretical studies of the visual chromophore, *Accts. Chem. Res.* **8**, 92-100 (1975).
18. C. D. B. Bridges, Absorption properties, interconversion and environmental adaptation of pigments from fish photoreceptors, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **30**, 317-334 (1965); C. D. B. Bridges, The rhodopsin-porphyrin visual system, *Handbook Sensory Physiol.* **7**(1), 417-480 (1972).
19. W. A. H. Rushton, The Ferrier Lecture: Visual adaptation, *Proc. Roy. Soc. B* **162**, 20-46 (1965).
20. P. A. Leibman, Microspectrophotometry of photoreceptors, *Handbook Sensory Physiol.* **7**, 481-528 (1972).
21. R. A. Cone, Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane, *Nature [New Biol.]* **236**, 39-43 (1972).
22. M. Poo and R. A. Cone, Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane, *Nature* **247**, 438-441 (1974).
23. P. A. Liebman and G. Entine, Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes, *Science* **185**, 457-459 (1974).
24. H. J. A. Dartnall and J. N. Lythgoe, The spectral clustering of visual pigments, *Vision Res.* **5**, 81-100 (1966).
25. G. Wald, Life and light, *Sci. Am.* **201**, 92-108 (1959).

26. B. Honig, A. D. Greenberg, U. Dinir, and T. G. Ebrey, Visual pigment spectra: Implications of the protonation of the retinal Schiff base, *Biochemistry* **15**, 4593-4599 (1976); D. S. Kliger, S. J. Milder, and E. A. Dratz, Solvent effects on the spectra of retinal Schiff bases: I. Models for the bathochromic shift of the chromophore spectrum in visual pigments, *Photochem. Photobiol.* **25**, 277-286 (1977).
27. A. S. Waggoner and L. Stryer, Induced optical activity of the metarhodopsins, *Biochemistry* **10**, 3250-3253 (1971).
28. B. Honig and T. G. Ebrey, The structure and spectra of the chromophore of the visual pigments, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 151-177 (1974).
29. A. Kropf, B. P. Whittenberger, S. P. Goff, and A. S. Waggoner, The spectral properties of some visual pigment analogs, *Exp. Eye Res.* **17**, 591-606 (1973).
30. E. L. Menger and D. S. Kliger, Photoisomerization kinetics of 11-*cis* retinal, its Schiff base, and its protonated Schiff base, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3975-3979 (1976).
31. T. P. Williams, An isochromic change in the bleaching of rhodopsin, *Vision Res.* **10**, 525-533 (1970).
32. A. A. Lamola, T. Yamane, and A. Zipp, Effects of detergents and high pressures upon the Metarhodopsin I  $\rightleftharpoons$  Metarhodopsin II equilibrium, *Biochemistry* **13**, 738-745 (1974).
33. W. J. De Grip, G. L. M. Van der Laar, F. J. M. Daemen, and S. L. Bonting, Biochemical aspects of the visual process. XXIII. Sulfhydryl groups and rhodopsin photolysis, *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 315-322 (1973).
34. S. L. Bonting and A. D. Bangham, On the biochemical mechanisms of the visual process, *Exp. Eye Res.* **6**, 400-413 (1967).
35. W. Zimmerman, M. Yost, and F. J. M. Daemen, Dynamics and function of vitamin A compounds in the rat retina after a small bleach of rhodopsin, *Nature* **250**, 66-67 (1974).
36. R. A. Cone and P. K. Brown, Spontaneous regeneration of rhodopsin in the isolated rat retina, *Nature* **221**, 818-820 (1969).
37. T. Tomita, Electrical activity of vertebrate photoreceptors, *Q. Rev. Biophys.* **3**, 179-222 (1970).
38. K. T. Brown and M. Murakami, Biphasic form of the early receptor potential of the monkey retina, *Nature* **204**, 739-740 (1964).
39. R. A. Cone and W. L. Pak, The early receptor potential, *Handbook Sensory Physiol.* **1**, 345-365 (1971).
40. R. A. Cone, Early receptor potential: photoreversible charge displacement in rhodopsin, *Science* **155**, 1128-1131 (1967).
41. W. A. Hagins and H. Ruppel, Fast photoelectric effects and the properties of vertebrate photoreceptors as electric cables, *Fed. Proc.* **30**, 64-78 (1971).
42. F. S. Werblin and J. E. Dowling, Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.* **32**, 339-355 (1969).
43. D. Baylor and A. Hodgkin, Changes in time scale and sensitivity in turtle photoreceptors, *J. Physiol. (Lond.)* **242**, 729-758 (1974); D. Baylor, A. Hodgkin, and T. Lamb, The electrical response of turtle cones to flashes and steps of light, *J. Physiol. (Lond.)* **242**, 685-727 (1974).
44. W. A. Hagins, R. D. Penn, and S. Yoshikami, Dark current and photocurrent in retinal rods, *Biophys. J.* **10**, 380-412 (1970).
45. W. A. Hagins, H. V. Zona, and R. G. Adams, Local membrane current in the outer segments of squid photoreceptors, *Nature* **194**, 844-847 (1962).
46. S. Yoshikami and W. A. Hagins, Control of the dark current in vertebrate rods and cones, *Biochemistry and Physiology of Visual Pigments* (H. Langer, ed.), pp. 245-255, Springer-Verlag, Berlin (1973).
47. J. E. Korenbrot and R. A. Cone, Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments, *J. Gen. Physiol.* **60**, 20-45 (1972).
48. M. Montal and J. I. Korenbrot, Rhodopsin in cell membranes and the process of phototransduction, in: *The Enzymes of Biological Membranes* (A. Martinosi, ed.), Vol. 4, pp. 365-405, Plenum Press, New York (1976).
49. K. Hong and W. L. Hubbell, Preparation and properties of phospholipid bilayers containing

- rhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2617-2621 (1972).
50. Y. S. Chen and W. L. Hubbell, Temperature- and light-dependent structural changes in rhodopsin-lipid membranes, *Exp. Eye Res.* **17**, 517-532 (1973).
  51. M. L. Applebury, D. M. Zuckerman, A. A. Lamola, and T. M. Jovin, Rhodopsin purification and recombination with phospholipids assayed by the Metarhodopsin I  $\rightarrow$  Metarhodopsin II transition, *Biochemistry* **13**, 3448-3458 (1974).
  52. W. A. Hagins and S. Yoshikami, A role for  $Ca^{++}$  in excitation of retinal rods and cones, *Exp. Eye Res.* **18**, 299-305 (1974).
  53. T. G. Ebrey and B. Honig, Molecular aspects of photoreceptor function, *Q. Rev. Biophys.* **8**, 129-184 (1975).
  54. T. J. Ostwald and J. Heller, Properties of magnesium- or calcium-dependent adenosine triphosphatase from frog rod photoreceptor outer segment disks and its inhibition by illumination, *Biochemistry* **11**, 4679-4686 (1972).
  55. D. Bownds, A. Brodie, W. E. Robinson, D. Palmer, D. J. Miller, and A. Shedlovsky, Physiology and enzymology of frog photoreceptor membranes, *Exp. Eye Res.* **18**, 253-269 (1974).
  56. H. Kühn, Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs, *Nature* **250**, 588-590 (1973).
  57. R. G. Pannbacker, Control of guanylate cyclase activity in the rod outer segment, *Science* **182**, 1138-1140 (1973).
  58. R. G. Pannbacker, D. E. Fleischman, and D. W. Reed, Cyclic nucleotide phosphodiesterase: High activity in mammalian photoreceptor, *Science* **175**, 757-758 (1972).
  59. N. Miki, J. J. Keirns, F. R. Marcus, J. Freeman, and M. W. Bitensky, Regulation of cyclic nucleotide concentration in photoreceptors: An ATP-dependent stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by light, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3820-3824 (1973).
  60. C. Goriadis, N. Virmaux, H. L. Cailla, and M. A. Lelaage, Rapid, light-induced changes of retinal cyclic GMP levels, *FEBS Lett.* **49**, 167-169 (1974).
  61. R. Rodieck, *The Vertebrate Retina*, Freeman, San Francisco, (Calif.) (1973).
  62. T. Cornsweet, *Visual Perception*, Academic Press, New York (1970).
  63. W. K. Noell, U. S. Walker, B. S. Kang, and S. Berman, Retinal damage by light in rats, *Invest. Ophthalmol.* **5**, 450-472 (1966).
  64. T. Kuwabara and R. A. Gorn, Retinal damage by visible light, *Arch. Ophthalmol.* **79**, 69-78 (1968).
  65. K. V. Anderson, F. P. Coyle, and W. K. O'Steen, Retinal degeneration produced by low intensity colored light, *Exp. Neurol.* **35**, 233-238 (1972).
  66. T. Lawwill, Effects of prolonged exposure of rabbit retina to low-intensity light, *Invest Ophthalmol.* **12**, 45-51 (1973); J. Marshall, J. Mellerio, and D. A. Palmer, Damage to pigeon retina by moderate illumination from fluorescent lamps, *Exp. Eye Res.* **14**, 164-169 (1972).
  67. C. C. Farnsworth and E. A. Dratz, Oxidative damage of the rod outer segment (ROS) disk membrane and the role of vitamin E, *Biochim. Biophys. Acta* **443**, 556-570 (1976).
  68. V. E. Kagan, A. A. Shvedova, K. N. Novikov, and Yu. P. Kozlov, Light induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retinas, *Biochim. Biophys. Acta* **330**, 76-79 (1973).

## 第 11 章

1. H. Smith, *Phytochrome and Photomorphogenesis: An Introduction to the Photocontrol of Plant Development*, McGraw-Hill, London (1975).
2. R. L. Satter and A. W. Galston, The physiological functions of phytochrome, in: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed. (T. W. Goodwin, ed.), Vol. 1, pp. 680-735 Academic Press, New York (1976).
3. K. Mitrakos and W. Shropshire, Jr. (eds.), *Phytochrome*, Academic Press, New York (1972).
4. William S. Hillman, *The Physiology of Flowering*, Holt, Rinehart, and Winston, New York (1962); Daphne Vince-Prue, *Photoperiodism in Plants*, McGraw-Hill, London (1975).

5. L. H. Flint and E. D. McAlister, Wavelengths of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light-sensitive lettuce seed, *Smithsonian Inst. Misc. Collections* **96**, 1-8 (1937).
6. R. E. Kendrick and H. Smith, Assay and isolation of phytochrome, in: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed. (T. W. Goodwin, ed.), Vol. 2, pp. 334-364 Academic Press, New York (1976).
7. G. R. Anderson, E. L. Jenner, and F. E. Mumford, Optical rotatory dispersion and circular dichroism spectra of phytochrome, *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 69-73 (1970).
8. W. Shropshire, Jr., W. H. Klein, and V. B. Elstad, Action spectra of photomorphogenic induction and photoinactivation of germination in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* **2**, 63-69 (1961).
9. W. O. Smith, Jr. and D. L. Correll, Phytochrome: A re-examination of the quaternary structure, *Plant Physiol.* **56**, 340-343 (1975).
10. W. O. Smith, Jr., Purification and Physicochemical Studies of Phytochrome, Ph.D. dissertation, University of Kentucky, Lexington, Ky., 90 pp. (1975).
11. S. J. Roux, S. G. Lisansky, and B. M. Stoker, Purification and partial carbohydrate analysis of phytochrome from *Avena sativa*, *Physiol. Plantarum* **35**, 85-90 (1975).
12. S. Grombein, W. Rüdiger, and H. Zimmermann, The structures of the phytochrome chromophore in both photoreversible forms, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **356**, 1709-1714 (1975).
13. T. Sugimoto, K. Ishikawa, and H. Suzuki, On the models for phytochrome chromophore. III, *J. Phys. Soc. Japan* **40**, 258-266 (1976).
14. W. Shropshire, Jr., Phytochrome, a photochromic sensor, *Photophysiology* **7**, 33-72 (1972).
15. W. H. Klein, J.-L. Edwards, and W. Shropshire, Jr., Spectrophotometric measurements of phytochrome *in vivo* and their correlation with photomorphogenic responses of *Phaseolus*, *Plant Physiol.* **42**, 264-270 (1967).
16. F. E. Mumford and E. L. Jenner, Catalysis of the phytochrome dark reaction by reducing agents, *Biochemistry* **10**, 98-101 (1971).
17. R. E. Kendrick and C. J. P. Spruit, Inverse dark reversion of phytochrome: An explanation, *Planta* **120**, 265-272 (1974).
18. K. M. Hartmann, A general hypothesis to interpret high energy phenomena of photomorphogenesis on the basis of phytochrome, *Photochem. Photobiol.* **5**, 349-366 (1966).
19. H. Lange, W. Shropshire, Jr., and H. Mohr, An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis, *Plant Physiol.* **47**, 649-655 (1971).
20. K. M. Hartmann, Ein Wirkungsspektrum der Photomorphogenese unter Hochenergiebedingungen und seine Interpretation auf der Basis des Phytochroms (Hypokotylwachstumshemmung bei *Lactuca sativa* L.), *Z. Naturforsch.* **22b**, 1172-1175 (1967).
21. E. Schäfer, A new approach to explain the "high-irradiance responses" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome, *J. Math. Biol.* **2**, 41-56 (1975).
22. A. Y. Gamterman and L. Y. Fukshanskii, Mathematical model of phytochrome, receptor of photomorphogenic processes in plants, *Ontogenez* **5**, 122-129 (1974).
23. C. J. Lamb and P. H. Rubery, Interpretation of the rate of density labelling of enzymes with  $^3\text{H}_2\text{O}$ , possible implications for the mode of action of phytochrome, *Biochim. Biophys. Acta* **421**, 308-318 (1976).
24. I. A. Newman, Electric responses of oats to phytochrome transformation, in: *Mechanisms of Regulation of Plant Growth* (R. L. Bielecki, A. R. Ferguson, and M. M. Gresswell, eds.), pp. 355-360, The Royal Society of New Zealand, Wellington Bulletin 12 (1974).
25. R. Caubergs and J. A. De Greef, Studies on hook-opening in *Phaseolus vulgaris* L. by selective R/FR pretreatments of embryonic axis and primary leaves, *Photochem. Photobiol.* **22**, 139-144 (1975).
26. B. Rubinstein, K. S. Drury and R. B. Park, Evidence for bound phytochrome in oat seedlings, *Plant Physiol.* **44**, 105-109 (1969).
27. P. H. Quail, Interaction of phytochrome with other cellular components, *Photochem. Photobiol.* **22**, 299-301 (1975).
28. L. H. Pratt, R. A. Coleman and J. M. MacKenzie, Jr., Immunological visualization of phyto-

- chrome, in: *Light and Plant Development*, Proceedings of the 22nd Nottingham Easter School in Agricultural Sciences, (H. Smith, ed.) Butterworth, London, 75-94 (1976).
29. C. W. Raven and W. Shropshire, Jr., Photoregulation of logarithmic fluence-response curves for phytochrome control of chlorophyll formation in *Pisum sativum* L., *Photochem. Photobiol.* **21**, 423-429 (1975).
  30. P. Halldal, *Photobiology of Microorganisms*, Wiley, New York (1970).
  31. K. Bergman, P. V. Burke, E. Cerda-Olmedo, C. N. David, M. Delbrück, K. W. Foster, E. W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D. S. Dennison, and W. Shropshire, Jr., *Phycomyces*, *Bacteriol. Rev.* **33**, 99-157 (1969).
  32. E. C. DeFabo, R. W. Harding, and W. Shropshire, Jr., Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*, *Plant Physiol.* **57**, 440-445 (1976).
  33. P.-S. Song and T. A. Moore, On the photoreceptor pigment for phototropism and phototaxis: Is a carotenoid the most likely candidate? *Photochem. Photobiol.* **19**, 435-441 (1974).
  34. V. Munoz and W. L. Butler, Photoreceptor pigment for blue light in *Neurospora crassa*, *Plant Physiol.* **55**, 421-426 (1975).
  35. K. L. Poff and W. L. Butler, Spectral characterization of the photoreducible b-type cytochrome of *Dictyostelium discoideum*, *Plant Physiol.* **55**, 427-429 (1975).
  36. M. Delbrück, A. Katzir, and D. Presti, Responses of *Phycomyces* indicating optical excitation of the lowest triplet state of riboflavin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1969-1973 (1976).
  37. R. J. Seviour and R. C. Codner, Effect of light on carotenoid and riboflavin production by the fungus, *Cephalosporium diospyri*, *J. Gen. Microbiol.* **77**, 403-415 (1973).
  38. P. P. Batra, Mechanism of light-induced carotenoid synthesis in nonphotosynthetic plants, *Photophysiology* **6**, 47-76 (1971).
  39. N. Lazaroff, Photomorphogenesis and nostocacean development, in: *The Biology of Blue-Green Algae*, pp. 270-319 (N. G. Carr and B. A. Whitton, eds.), Blackwell, Oxford (1973).
  40. A. Bennett and L. Bogorad, Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga, *J. Cell Biol.* **58**, 419-435 (1973).
  41. J. Scheibe, Photoreversible pigment: Occurrence in a blue-green alga, *Science* **176**, 1037-1039 (1972).
  42. A. C. Leopold, Flower initiation in total darkness, *Plant Physiol.* **24**, 530-533 (1949).
  43. E. C. Humphries and A. W. Wheeler, The physiology of leaf growth, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **14**, 385-410 (1963).
  44. G. A. Pieters, The growth of sun and shade leaves of *Populus euramericana* "Robusta" in relation to age, light intensity and temperature, *Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen* **11**, 1-106 (1974).
  45. W. Starzecki, The roles of the palisade and spongy parenchymas of leaves in photosynthesis, *Acta Soc. Bot. Polon.* **31**, 419-436 (1962).
  46. T. Gorski, Germination of seeds in the shadow of plants, *Physiol. Plantarum* **34**, 342-346 (1975).
  47. W. Shropshire, Jr., Photoinduced parental control of seed germination and the spectral quality of solar radiation, *Solar Energy* **15**, 99-105 (1973).
  48. B. Goldberg and W. H. Klein, Variations in the spectral distribution of daylight at various geographical locations on the earth's surface, *Solar Energy* **19**, 3-13 (1976).
  49. W. H. Klein, personal communication (1974).
  50. L. G. Paleg and D. Aspinall, Field control of plant growth and development through the laser activation of phytochrome, *Nature* **228**, 970-973 (1970).
  51. Anonymous, "But who needs sun at night?", *Sky Telescope* **32**, 183, 210 (1966).
  52. L. E. Scheving, Chronobiology, in: *Chronobiology* (L. E. Scheving, F. Holberg, and J. E. Pauly, eds.), pp. 221-223, Igaku Shoin, Tokyo (1974).
  53. S. Rand, personal communication (1975).
  54. H. Cathey and L. E. Campbell, Effectiveness of five vision-lighting sources on photo-regulation of 22 species of ornamental plants, *J. Am. Hort. Sci.* **100**, 65-71 (1975).
  55. W. H. Klein, Some responses of the bean hypocotyl, *Am. Biol. Teach.* **25**, 104-106 (1963).

56. R. D. Powell, A simple experiment for studying the effect of red and far red light on growth of leaf disks, *Am. Biol. Teach.* **25**, 107-109 (1963).
57. H. J. Vogel, A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N), *Microb. Gener. Bull.* **13**, 42 (1956).

## 第 12 章

1. G. S. Fraenkel and D. L. Gunn, *The Orientation of Animals: Kineses, Taxes and Compass Reactions*, Dover Press, New York (1961).
2. D. L. Gunn, J. S. Kennedy, and D. P. Fielou, Classification of taxes and kineses, *Nature* **140**, 1064-1067 (1937).
3. N. G. Ball, Plant tropisms, *Vistas Botany* **3**, 228-254 (1963).
4. L. J. Audus, *Plant Growth Substances*, Interscience, New York (1959).
5. R. K. De La Fuente and A. C. Leopold, Lateral movement of auxin in phototropism, *Plant Physiol.* **43**, 1031-1036 (1968).
6. K. Bergman, P. B. Burke, E. Cerda-Olmedo, C. N. David, M. Delbrück, K. W. Foster, E. W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D. S. Dennison, and W. Shropshire, Jr., *Phycomyces*, *Bacteriol. Rev.* **33**, 99-157 (1969).
7. J. J. Wolken, *Invertebrate Photoreceptors: A Comparative Analysis*, Academic Press, New York (1971).
8. H. S. Jennings, *Behavior of the Lower Organisms*, Columbia University Press, New York (1906).
9. S. O. Mast, *Light and the Behavior of Organisms*, Wiley, New York (1911).
10. W. G. Hand and D. Davenport, The experimental analysis of phototaxis and photokineses in flagellates, in: *Photobiology of Microorganisms* (P. Halldal, ed.), pp. 253-282, Wiley, London (1970).
11. D. Davenport, G. J. Culler, J. O. B. Greaves, R. B. Forward, and W. G. Hand, The investigation of the behavior of microorganisms by computerized television, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **17**, 230-237 (1970).
12. H. C. Berg, How to track bacteria, *Rev. Sci. Instr.* **42**, 868-871 (1971).
13. T. L. Jahn and E. C. Bovee, Locomotive and motile response in *Euglena*, in: *The Biology of Euglena* (D. E. Beutow, ed.), Vol 1, pp. 45-108, Academic Press, New York (1968).
14. W. G. Hand, Phototactic orientation by the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum* Kofoid. I. A mechanism model, *J. Exp. Biol.* **174**, 33-38 (1970).
15. W. G. Hand and J. Schmidt, Phototactic orientation by the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum* Kofoid. II. Flagellar activity and overall response mechanism, *J. Protozool.* **22**, 494-498 (1975).
16. J. D. Dodge and R. M. Crawford, Observations of the fine structure of the eyespot and associated organelles in the dinoflagellate *Glenodinium foliaceum*, *J. Cell Sci.* **5**, 479-493 (1969).
17. G. Tollin and M. I. Robinson, Phototaxis in *Euglena*. V. Photosuppression of phototactic activity by blue light, *Photochem. Photobiol.* **9**, 411-418 (1969).
18. R. B. Forward, Jr., Phototaxis in a dinoflagellate: Action spectra as evidence for a two-pigment system, *Planta* **111**, 167-178 (1973).
19. Y. Naitoh and R. Eckert, Ionic mechanisms controlling behavioral responses of *Paramecium* to mechanical stimulation, *Science* **164**, 963-965 (1969).
20. M. A. Sleight, *Cilia and Flagella*, Academic Press, New York (1974).
21. H. E. Walter, The reactions of planarians to light, *J. Exp. Zool.* **5**, 35-162 (1907).
22. P. Ulyyott, The behaviour of *Dendrocoelum lacteum*. II. Responses in non-directional gradients, *J. Exp. Biol.* **13**, 265-278 (1936).
23. J. F. Rohlf and D. Davenport, Simulation of simple models of animal behavior with a digital computer, *J. Theor. Biol.* **23**, 400-424 (1969).
24. G. Surtees, Laboratory studies on dispersion behaviour of adult beetles in grain. VIII. Spontaneous activity in three species and a new approach to analysis of kinesis mechanisms, *Anim. Behav.* **12**, 374-377 (1964).



25. W. Haupt, Perception of light direction in oriented displacements of cell organelles, *Acta Protozool.* **11**, 179-188 (1972).
26. K. von Frisch, *Bees: Their Chemical Senses, Vision and Language*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y. (1950).
27. P.-H. Wells and A. Wenner, Do honeybees have a language?, *Nature* **141**, 171-175 (1973).
28. M. Renner, The contribution of the honey bee to the study of time-sense and astronomical orientation, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 361-367 (1960).
29. D. R. Griffin, Bird navigation, in: *Recent Studies in Avian Biology* (A. Wolfson, ed.), pp. 154-197, University of Illinois Press, Urbana, Ill. (1955).
30. O. Siebeck, Researches on the behaviour of planktonic crustaceans in the littoral, *Int. Ver. Limnol.* **15**, 746-751 (1964).
31. F. Papi and L. Pardi, On lunar orientation of sandhoppers (*Amphipoda talitridae*), *Biol. Bull.* **124**, 97-105 (1962).
32. L. Pardi, Innate components in the solar orientation of littoral amphipods, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 395-401 (1960).
33. R. B. Forward, Jr., Light and diurnal vertical migration: Photobehavior and photophysiology of plankton, in: *Photochemical and Photobiological Reviews* (K. C. Smith, ed.), Vol. 1, pp. 157-209, Plenum Press, New York (1976).

## 第 13 章

1. R. K. Clayton, Photochemical reaction centers and photosynthetic membranes, *Adv. Chem. Phys.* **19**, 353-378 (1971).
2. R. K. Clayton, Primary processes in bacterial photosynthesis, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **2**, 131-156 (1973).
3. P. Loach and J. J. Katz, Primary photochemistry of photosynthesis, *Photochem. Photobiol.* **17**, 195-208 (1973).
4. M. D. Kamen, *Primary Processes in Photosynthesis*, Academic Press, New York and London (1963).
5. R. K. Clayton, *Molecular Physics in Photosynthesis*, Blaisdell, New York and London (1965).
6. L. P. Vernon and G. R. Seely (eds.), *The Chlorophylls*, Academic Press, New York and London (1966).
7. A. San Pietro, F. A. Greer, and T. J. Army (eds.), *Harvesting The Sun-Photosynthesis In Plant Life*, Academic Press, New York and London (1967).
8. E. Rabinowitch and Govindjee, *Photosynthesis*, Wiley, New York (1969).
9. R. K. Clayton, *Light and Living Matter*, Vol. 1: *The Physical Part*, McGraw-Hill, New York (1970).
10. R. P. F. Gregory, *Biochemistry of Photosynthesis*, Wiley-Interscience, London (1971).
11. D. O. Hall and K. K. Rao, *Photosynthesis, Studies in Biology*, No. 37, Edward Arnold, London (1972).
12. R. K. Clayton, *Photosynthesis: How Light is Converted to Chemical Energy*, Addison-Wesley Module in Biology No. 13, Addison-Wesley, Reading, Mass. (1974).
13. Govindjee and R. Govindjee, The absorption of light in photosynthesis, *Sci. Am.* **231**, 68-82 (1974).
14. Govindjee (ed.), *Bioenergetics of Photosynthesis*, Academic Press, New York and London (1975).
15. A. L. Lehninger, *Biochemistry*, Chap. 34, Worth, New York (1970).
16. D. H. Kenyon and G. Steinman, *Biochemical Predestination*, McGraw-Hill, New York (1969).
17. A. I. Oparin, The origin of life and the origin of enzymes, *Adv. Enzymol.* **27**, 347-380 (1965).
18. S. W. Fox, Self-ordered polymers and propagative cell-like systems, *Naturwissenschaften* **56**, 1-9 (1969).
19. J. H. C. Smith and C. S. French, The major and accessory pigments in photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **14**, 181-224 (1963).

20. J. S. Brown, Forms of chlorophyll *in vivo*, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **23**, 73-86 (1972).
21. Govindjee and B. Z. Braun, Light absorption, emission, and photosynthesis, in: *Algal Physiology and Biochemistry* (W. D. P. Stewart, ed.), pp. 346-390 University of California Press, Berkeley, Calif. (1974).
22. H. Y. Yamamoto, T. O. M. Nakayama, and C. O. Chichester, Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls, *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 168-173 (1962).
23. D. Siefertmann and H. Y. Yamamoto, Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. V. Dehydroascorbate, a link between photosynthetic electron transport and de-epoxidation. *Proc. 3rd Int. Congr. Photosyn.* (M. Avron, ed.), pp. 1991-1998 (1974).
24. K. Sauer, Primary events and the trapping of energy, in: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 115-181, Academic Press, New York (1975).
25. D. E. Fleischman and B. C. Mayne, Chemically and physically induced luminescence as a probe of photosynthetic mechanisms, *Curr. Top. Bioenerg.* **5**, 77-105 (1973).
26. J. Lavorel, Luminescence, in *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 223-317, Academic Press, New York (1975).
27. G. Hoch and R. S. Knox, Primary processes in photosynthesis, *Photophysiology* **3**, 225-251 (1968).
28. R. S. Knox, Excitation energy transfer and migration: Theoretical considerations, in: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 183-221, Academic Press, New York (1975).
29. T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Physik.* **2**, 55-75 (1948).
30. T. Förster, Delocalized excitation and excitatioq transfer, in: *Modern Quantum Chemistry, Part III, Action of Light and Organic Molecules* (O. Sinanoglu, ed.), pp. 93-137, Academic Press, New York (1965).
31. D. C. Fork and J. Amesz, Spectrophotometric studies of the mechanism of photosynthesis, *Photophysiology* **5**, 97-126 (1970).
32. D. C. Fork and J. Amesz, Action spectra and energy transfer in photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **20**, 305-328 (1969).
33. F. T. Haxo, Wavelength dependence of photosynthesis and the role of accessory pigments, in: *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems* (M. B. Allen, ed.), Academic Press, New York and London (1960).
34. J. Myers, Enhancement studies in photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 289-312 (1971).
35. J. Myers and C. S. French, Relationships between time course, chromatic transients, and enhancement phenomena of photosynthesis, *Plant Physiol.* **35**, 963-969 (1960).
36. R. Hill and F. Bendall, Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis, *Nature* **186**, 136-137 (1960).
37. L. N. M. Duysens, J. Amesz, and B. M. Kamp, Two photochemical systems in photosynthesis, *Nature* **190**, 510-511 (1961).
38. B. Kok and W. Gott, Activation spectra of 700 m $\mu$  absorption change in photosynthesis, *Plant Physiol.* **35**, 802-808 (1960).
39. C. Bonaventura and J. Myers, Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 366-383 (1969).
40. N. Murata, Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*, *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 242-251 (1969).
41. N. Murata, Control of excitation transfer in photosynthesis. IV. Kinetics of chlorophyll a fluorescence in *Porphyra yezoensis*, *Biochim. Biophys. Acta* **205**, 379-389 (1970).
42. N. Murata, Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 171-181 (1969).
43. N. Murata, Control of excitation transfer in photosynthesis. V. Correlation of membrane structure to regulation of excitation transfer between two pigment systems in isolated spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **245**, 365-372 (1971).

44. N. Murata, H. Tashiro, and A. Takamiya, Effects of divalent metal ions on chlorophyll *a* fluorescence in isolated spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **197**, 250-256 (1970).
45. T. Hiyama and B. Ke, Difference spectra and extinction coefficients of P700, *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 160-172 (1972).
46. T. Hiyama and B. Ke, A new photosynthetic pigment "P430": Its possible role as the primary electron acceptor of photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1010-1013 (1971).
47. T. Hiyama and B. Ke, A further study of P430: A possible primary electron acceptor of photosystem I, *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 99-108 (1971).
48. A. J. Bearden and R. Malkin, Primary photochemical reactions in chloroplast photosynthesis, *Q. Rev. Biophys.* **7**, 131-177 (1975).
49. J. W. M. Visser, K. P. Rijgersberg, and J. Ames, Light-induced reactions of ferredoxin and P700 at low temperatures, *Biochim. Biophys. Acta* **368**, 235-246 (1974).
50. D. O. Hall, R. Cammack, and K. K. Rao, Non-haem iron proteins, in: *Iron in Biochemistry and Medicine* (A. Jacob and M. Worwood, eds.), Academic Press, New York and London (1974).
51. W. L. Butler, Primary photochemistry of photosystem II of photosynthesis, *Accounts Chem. Res.* **6**, 177-184 (1973).
52. G. Döring, G. Renger, J. Vater, and H. T. Witt, Properties of the photoactive chlorophyll *a*-II in photosynthesis, *Z. Naturforsch. [B]* **24**, 1139-1143 (1969).
53. R. H. Floyd, B. Chance, and D. DeVault, Low temperature photoinduced reactions in green plants and chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **226**, 103-112 (1971).
54. L. N. M. Duysens and H. E. Sweers, Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence, in: *Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, pp. 353-372, University of Tokyo Press, Tokyo (1963).
55. D. B. Knaff and D. I. Arnon, Spectral evidence for a new photoreactive component of the oxygen-evolving system in photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**, 963-969 (1969).
56. K. Erixon and W. L. Butler, The relationship between Q, C550 and cytochrome *b*<sub>559</sub> in photoreactions at -196°C in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 381-389 (1971).
57. K. Erixon and W. L. Butler, Light-induced absorbance changes in chloroplasts at -196°C, *Photochem. Photobiol.* **14**, 427-433 (1971).
58. S. Okayama and W. L. Butler, Extraction and reconstitution of photosystem II, *Plant Physiol.* **49**, 769-774 (1972).
59. R. Malkin and D. Knaff, Effect of oxidizing treatment on chloroplast photosystem II reactions, *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 336-340 (1973).
60. P. Joliot, G. Barbieri, and R. Chabaud, Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II, *Photochem. Photobiol.* **10**, 309-329 (1969).
61. B. Kok, B. Forbush, and M. McGloin, Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.* **11**, 457-475 (1969).
62. G. M. Chéniaie, Photosystem II and O<sub>2</sub> evolution, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **21**, 467-498 (1970).
63. M. Schwartz, The relation of ion transport to phosphorylation, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 469-484 (1971).
64. M. Avron and J. Neumann, Photophosphorylation in chloroplasts, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **19**, 137-166 (1968).
65. G. Hind and A. T. Jagendorf, Separation of light and dark stages in phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 715-722 (1963).
66. A. T. Jagendorf, Mechanism of phosphorylation, in: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 413-492, Academic Press, New York (1975).
67. P. Mitchell, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* **191**, 144-148 (1961).
68. P. Mitchell, Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Biol. Rev.* **41**, 445-502 (1966).
69. G. Hind and A. T. Jagendorf, The effect of uncouplers on the conformational and high energy states of chloroplasts, *J. Biol. Chem.* **240**, 3202-3209 (1965).
70. A. T. Jagendorf and E. Uribe, ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 170-177 (1966).

71. R. A. Dilley, Coupling of ion and electron flow in chloroplasts, *Curr. Top. Bioenerg.* **4**, 237-271 (1971).
72. H. Baltscheffsky and M. Baltscheffsky, Energy conversion reactions in bacterial photosynthesis, *Curr. Top. Bioenerg.* **4**, 273-325 (1971).
73. D. C. Fork and J. Ames, Light-induced shifts in the absorption spectrum of carotenoids in red and brown algae, *Photochem. Photobiol.* **6**, 913-918 (1967).
74. D. C. Fork, Light-induced shifts in the absorption spectrum of carotenoids and chlorophyll *b* in the green alga *Ulva*, *Carnegie Inst. Year Book* **72**, 374-376 (1973).
75. H. T. Witt, Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis, *Q. Rev. Biophys.* **4**, 365-437 (1971).
76. H. T. Witt, B. Rumberg, W. Junge, G. Döring, H. H. Stiehl, J. Weikard, and Ch. Wolff, Evidence for the coupling of electron transfer, field changes, proton translocation and phosphorylation in photosynthesis, *Prog. Photosyn. Res.* **3**, 1361-1373 (1969).
77. D. Branton, Structure of the photosynthetic apparatus, *Photophysiology* **3**, 197-224 (1968).
78. C. J. Arntzen and J.-M. Briantais, Chloroplast structure and function, in: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed.), pp. 51-113 Academic Press, New York (1975).
79. J. A. Bassham, Kinetic studies of photosynthetic carbon reduction cycle, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **15**, 101-120 (1964).
80. M. D. Hatch and C. R. Slack, Photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation pathways, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **21**, 141-162 (1970).
81. O. Björkman and J. Berry, High efficiency photosynthesis, *Sci. Am.* **229**, 80-93 (1973).
82. M. Calvin, Solar energy by photosynthesis, *Science* **184**, 375-381 (1974).
83. T. W. Goodwin (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, New York and London (1965).
84. A. Dunn and J. Arditti, *Experimental Physiology*, Holt, Rinehart, and Winston, New York (1968).
85. J. McD. Armstrong, The molar extinction of 2,6-dichlorophenol indophenol, *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 194-197 (1964).
86. D. I. Aron, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* **24**, 1-15 (1949).

## 第 14 章

1. M. J. Cormier, D. M. Hercules, and J. Lee (eds.), *Chemiluminescence and Bioluminescence*. Plenum Press, New York (1973).
2. E. H. White, J. D. Miano, C. J. Watkins, and E. J. Breaux, Chemically produced excited states, *Angew. Chem. [Engl.]* **13**, 229-243 (1974).
3. M. J. Cormier, J. Lee, and J. E. Wampler, Bioluminescence: Recent advances, *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 255-272 (1975).
4. F. H. Johnson and Y. Haneda (eds.), *Bioluminescence in Progress*, Princeton University Press, Princeton, N.J. (1965).
5. L. J. Bowie, R. Irwin, M. Loken, M. DeLuca, and L. Brand, Excited-state proton transfer and the mechanism of action of firefly luciferase, *Biochemistry* **12**, 1852-1857 (1973).
6. O. Shimomura, F. H. Johnson, and T. Masugi, Cypridina bioluminescence: Light-emitting oxyluciferin-luciferase complex, *Science* **164**, 1299-1300 (1969).
7. M. J. Cormier, K. Horl, and J. M. Anderson, Bioluminescence in coelenterates, *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 137-164 (1974).
8. W. W. Ward and H. H. Seliger, Properties of mnemiopsin and berovin calcium activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis* sp. and *Beroe ovata*, *Biochemistry* **13**, 1500-1509 (1974).
9. A. M. Michelson and M. F. Isambert, Bioluminescence. XI. *Pholas dactylus* system. Mechanism of luciferase, *Biochimie* **55**, 618-634 (1973).
10. R. Bellisario, T. E. Spencer, and M. J. Cormier, Isolation and properties of luciferase, a non-

- heme peroxidase, from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa*, *Biochemistry* **11**, 2256-2266 (1972).
11. G. M. Barenboim, A. N. Domanskii, and K. K. Turoverov, *Luminescence of Biopolymers and Cells* (translated from Russian), Plenum Press, New York (1969).
12. R. C. Allen, R. L. Stjernholm, and R. H. Steele, Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bacteriostatic activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 679-684 (1972).
13. H. H. Seliger, Origin of bioluminescence, *Photochem. Photobiol.* **21**, 335-361 (1975).
14. H. H. Seliger and W. D. McElroy, *Light: Physical and Biological Action*, Academic Press, New York (1965).
15. J. E. Lloyd, Bioluminescent communication in insects, *Annu. Rev. Entomol.* **16**, 97-122 (1971).
16. W. E. Esaias and H. C. Curl, Effects of dinoflagellate bioluminescence on copepod ingestion rates, *Limnol. Oceanogr.* **17**, 901-906 (1972).
17. E. N. Harvey, *Bioluminescence*, Academic Press, New York (1952).
18. P. E. Stanley, Analytical bioluminescence assays using the liquid scintillation spectrometer. A review, *Liquid Scintillation Counting* (M. A. Crook and P. Johnson, eds.), Vol. 3, pp. 253-271, Heyden, London (1974).
19. B. L. Strehler, Bioluminescence assay: Principles and practice, *Methods Biochem. Anal.* **16**, 99-181 (1968).
20. E. Chappelle and G. L. Picciolo, Assay of flavine mononucleotide (FMN) and flavine-adenine dinucleotide (FAD) using the bacterial luciferase reaction, *Methods Enzymol.* **18**, 381-385 (1971).
21. F. H. Johnson and O. Shimomura, Preparation and use of aequorin for rapid microdetermination of calcium ions in biological systems, *Nature New Biol.* **237**, 287-288 (1972).
22. J. R. Blinks, F. G. Prendergast, and D. G. Allen, Photoproteins as biological calcium indicators, *Pharmacol. Rev.* **28**, 1-93 (1976).
23. G. T. Reynolds, Image intensification applied to biological problems, *Q. Rev. Biophys.* **5**, 295-347 (1972).

## 第 15 章

1. F. Urbach (ed.), *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation*, p. 363, Pergamon Press, N.Y. (1969).
2. R. C. Smith and J. E. Tyler, Transmission of solar radiation into natural waters, in: *Photochemical and Photobiological Reviews* (K. C. Smith, ed.), Vol. 1, pp. 117-155, Plenum Press, New York (1976).
3. M. Luckiesh, *Applications of Germicidal, Erythematous and Infrared Energy*, Van Nostrand, New York (1946).
4. K. H. Norris and W. L. Butler, Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples, *IRE Trans. Bio-Med. Electron.* **8**, 153-157 (1961).
5. D. R. Laub, D. J. Prolo, W. Whittlesey, and H. Buncke, Jr., Median cerebrofacial dysgenesis, *Calif. Med.* **112**, 19-21 (1970).
6. W. L. Butler, Absorption spectroscopy *in vivo*: Theory and application. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **15**, 451-470 (1964).
7. K. H. Norris, Measuring and using light transmittance properties of plant materials, in: *Electromagnetic Radiation in Agriculture*, pp. 64-66, Illuminating Engineering Society, New York (1965).
8. A. Rosencwaig, Photoacoustic spectroscopy—A new tool for investigation of solids, *Anal. Chem.* **47**(6), 592A-604A (1975).
9. E. S. Vesell and C. M. Long (co-chairman), Environmental and genetic factors affecting laboratory animals: Impact on biomedical research, *Fed. Proc.* **35**, 1123-1165 (1976).
10. J. N. Ott, *Health and Light* (The Effects of Natural and Artificial Light on Man and Other Living Things), Devin-Adair, Old Greenwich, Conn. (1973).

11. P. G. Natali and E. M. Tan, Immunological detection of thymidine photoproduct formation *in vivo*, *Radiat. Res.* **46**, 506-518 (1971).
12. C. J. Lucas, Immunological demonstration of the disappearance of pyrimidine dimers from nuclei of cultured human cells, *Exp. Cell Res.* **74**, 480-486 (1972).
13. E. M. Tan and R. B. Stoughton, Ultraviolet light-induced damage to deoxyribonucleic acid in human skin, *J. Invest. Dermatol.* **52**, 537-542 (1969).
14. E. M. Tan, R. G. Freeman, and R. B. Stoughton, Action spectrum of ultraviolet light-induced damage to nuclear DNA *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.* **55**, 439-443 (1970).
15. E. Seaman, H. van Vunakis, and L. Levine, Serologic estimation of thymine dimers in the deoxyribonucleic acid of bacterial and mammalian cells following irradiation with ultraviolet light and postirradiation repair, *J. Biol. Chem.* **247**, 5709-5715 (1972).
16. M. L. Kripke and M. S. Fisher, Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 211-215 (1976).
17. D. H. Hug, D. Roth, and J. K. Hunter, Photoactivation of an enzyme and biological photoreception: An hypothesis, *Physiol. Chem. Phys.* **3**, 353-360 (1971).
18. D. Roth and D. H. Hug, Photoactivation of urocanase in *Pseudomonas putida*: Action spectrum, *Radiat. Res.* **50**, 94-104 (1972).
19. D. H. Hug and D. Roth, Photoactivation of urocanase in *Pseudomonas putida*: Purification of inactive enzyme, *Biochemistry* **10**, 1397-1402 (1971).
20. J. F. Baugher and L. I. Grossweiner, Ultraviolet inactivation of papain, *Photochem. Photobiol.* **22**, 163-167 (1975).
21. H. S. Johnson, NADP-malate dehydrogenase: Photoactivation in leaves of plants with Calvin Cycle photosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 703-709 (1971).
22. M. Weller, N. Virmaux, and P. Mandel, Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: The presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 381-385 (1975).
23. H. Kaufman, S. M. Vratsanos, and B. F. Erlanger, Photoregulation of an enzymic process by means of a light-sensitive ligand, *Science* **162**, 1487-1489 (1968).
24. J. Bieth, N. Wassermann, S. M. Vratsanos, and B. F. Erlanger, Photoregulation of biological activity by photochromic reagents, IV. A model for diurnal variation of enzymic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 850-854 (1970).
25. S. Comorosan, The measurement process in biological systems: A new phenomenology, *J. Theor. Biol.* **51**, 35-49 (1975).
26. F. L. Gates, A study of the bactericidal action of ultraviolet light. III. The absorption of ultraviolet light by bacteria, *J. Gen. Physiol.* **14**, 31-42 (1930).
27. A. A. Lamola, M. Gueron, T. Yamane, J. Eisinger, and R. G. Shulman, Triplet state of DNA, *J. Chem. Phys.* **47**, 2210-2217 (1967).
28. R. M. Tyrrell, Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation, *Photochem. Photobiol.* **17**, 69-73 (1973).
29. R. B. Webb, Lethal and mutagenic effects of near-ultraviolet radiation, in: *Photochemical and Photobiological Reviews*, Vol. 2, (K. C. Smith, ed.), pp. 169-261, Plenum Press, New York (1977).
30. H.-D. Menningmann and A. Wacker, Photoreactivation of *Escherichia coli* B<sub>3</sub> after inactivation by 313 nm radiation in the presence of acetone, *Photochem. Photobiol.* **11**, 291-296 (1970).
31. K. C. Smith (ed.), *Aging, Carcinogenesis, and Radiation Biology (The Role of Nucleic Acid Addition Reactions)*, Plenum Press, New York (1976).
32. J. Jagger, Growth delay and photoprotection induced by near-ultraviolet light, *Res. Prog. Org. Biol. Med. Chem.* **3**, 383-401 (1972).
33. R. B. Webb, Photodynamic lethality and mutagenesis in the absence of added sensitizers, *Res. Prog. Org. Biol. Med. Chem.* **3**, 511-530 (1972).
34. T. V. Ramabhadran and J. Jagger, Mechanism of growth delay induced in *Escherichia coli* by near ultraviolet radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 59-63 (1976).
35. R. M. Tyrrell, R. D. Ley, and R. B. Webb, Induction of single-strand breaks (alkali-labile bonds)

- in bacterial and phage DNA by near UV (365 nm) radiation, *Photochem. Photobiol.* **20**, 395-398 (1974).
36. J. P. McCormick, J. R. Fischer, J. P. Pachlatko, and A. Eisenstark, Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan:hydrogen peroxide, *Science* **191**, 468-469 (1976).
  37. R. B. Webb and M. M. Malina, Mutagenic effects of near ultraviolet and visible radiant energy on continuous cultures of *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol.* **12**, 457-468 (1970).
  38. S. A. Gordon, A. N. Stroud, and C. H. Chen, The introduction of chromosomal aberrations in pig kidney cells by far-red light, *Radiat. Res.* **45**, 274-287 (1971).
  39. C. H. Chen and S. A. Gordon, Inhibition of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation in pig kidney cells by far-red light, *Photochem. Photobiol.* **15**, 107-109 (1972).
  40. R. M. Klein and P. C. Edsall, Interference by near ultraviolet and green light with growth of animal and plant cell cultures, *Photochem. Photobiol.* **6**, 841-850 (1967).
  41. H. Ninnemann and B. Epel, Inhibition of cell division by blue light, *Exp. Cell Res.* **79**, 318-326 (1973).
  42. A. Shatkey and I. Michaeli, EPR study of wool irradiated with blue light, *Photochem. Photobiol.* **15**, 119-138 (1972).
  43. N. I. Krinsky, Cellular damage initiated by visible light, in: *The Survival of Vegetative Microbes* (T. G. R. Gray and J. R. Postgate, eds.) (Soc. Gen. Biol. Symp. No. 26), pp. 209-239, Cambridge University Press, London (1976).
  44. P. Halpern, J. V. Dave, and N. Braslaw, Sea-level solar radiation in the biologically active spectrum, *Science* **186**, 1204-1208 (1974).
  45. D. Mackay, A. Eisenstark, R. B. Webb, and M. S. Brown, Action spectra for lethality in recombinationless strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol.* **24**, 337-343 (1976).
  46. M. J. Peak, J. G. Peak, and R. B. Webb, Synergism between different near-ultraviolet wavelengths in the inactivation of transforming DNA, *Photochem. Photobiol.* **21**, 129-131 (1975).
  47. K. D. Martignoni and K. C. Smith, The synergistic action of ultraviolet and X radiation on mutants of *Escherichia coli* K-12, *Photochem. Photobiol.* **18**, 1-8 (1973).
  48. R. M. Tyrrell, The interaction of near UV (365 nm) and X-radiations on wild-type and repair deficient strains of *Escherichia coli* K-12: Physical and biological measurements, *Int. J. Radiat. Biol.* **25**, 373-390 (1974).
  49. S. Wolf and H. E. Luippold, Mitotic delay and the apparent synergism of far-red radiation and X-rays in the production of chromosomal aberrations, *Photochem. Photobiol.* **4**, 439-445 (1965).
  50. I. Willis, A. Kligman, and J. H. Epstein, Effects of long ultraviolet rays on human skin: Photoprotective or photoaugmentative? *J. Invest. Dermatol.* **59**, 416-420 (1972).
  51. W. C. Dewey, L. E. Hopwood, S. A. Sapareto, and L. E. Gerweck, Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation, *Radiology* **123**, 463-474 (1977).
  52. R. M. Tyrrell, Synergistic lethal action of ultraviolet-violet radiations and mild heat in *Escherichia coli*, *Photochem. Photobiol.* **24**, 345-351 (1976).
  53. J. H. Epstein, Ultraviolet carcinogenesis, *Photophysiology* **5**, 235-273 (1970).
  54. R. M. Tyrrell, RecA<sup>+</sup>-dependent synergism between 365 nm and ionizing radiation in log-phase *Escherichia coli*: A model for oxygen-dependent near-UV inactivation by disruption of DNA repair, *Photochem. Photobiol.* **23**, 13-20 (1976).
  55. K. C. Smith and K. D. Martignoni, Protection of *Escherichia coli* cells from ultraviolet and X-irradiation by prior X-irradiation: A genetic and physiological study, *Photochem. Photobiol.* **24**, 515-523 (1976).
  56. E. M. Witkin, Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*, *Bacteriol. Rev.* **40**, 869-907 (1976).
  57. P. R. Schimmel, G. P. Budzik, S. S. M. Lam, and H. J. P. Shoemaker, *In Vitro* studies of photochemically cross-linked protein-nucleic acid complexes. Determinations of cross-linked regions and structural relationships in specific complexes, in: *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology* (K. C. Smith, ed.), pp. 123-148, Plenum Press, New York (1976).



58. T. T. Puck and F.-T. Kao, Genetics of somatic mammalian cells. V. Treatment with 5-bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1227-1234 (1967).
59. J. D. Regan, R. B. Setlow, and R. D. Ley, Normal and defective repair of damaged DNA in human cells: A sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 708-712 (1971).
60. F. Hutchinson, The lesions produced by ultraviolet light in DNA containing 5-bromouracil, *Q. Rev. Biophys.* **6**, 210-246 (1973).
61. L. A. Herzenberg, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg, Fluorescence-activated cell sorting, *Sci. Am.* **234**, 108-117 (1976).
62. P. M. Kraemer, L.-L. Deaven, H. A. Crissman, J. A. Steinkamp, and D. F. Petersen, On the nature of heteroploidy, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 133-144 (1974).
63. M. W. Berns, Biological, photochemical, and spectroscopic application of lasers, *Photochemical and Photobiological Reviews*, Vol. 2 (K. C. Smith, ed.), pp. 1-37, Plenum Press, New York (1977).

北京植物所

收到期	84. 7. 5.
来源	西单新
书价	2.70
单据号	0388988
开票日期	84. 7. 5.





S0011838

58.1716

23615

95 176

赤通文

84.11.13

19841218 98 243 201 1215

12 198614 15 716

347 86.7.1

1986.8 11

8.15

58.1716

# 注 意

176

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

23615

京卡0701

统一书号:

定 价:

本社书号

科技新